

201432007A

厚生労働科学研究委託費

再生医療実用化研究事業

脂肪組織由来多系統前駆細胞を用いた
抗炎症・肝線維溶解療法の開発

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 松山 晃文

平成27 (2015) 年 3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究
委託事業による委託業務として、独立行政法
人医薬基盤研究所 理事長 米田 悦啓が実
施した平成26年度「脂肪組織由来多系統前
駆細胞を用いた抗炎症・肝線維溶解療法の開
発」の成果を取りまとめたものです。

目次

I. 委託業務成果報告（総括）

「脂肪組織由来多系統前駆細胞を用いた抗炎症・肝線維溶解療法の開発に関する研究 —脂肪組織由来多系統前駆細胞試験物概要書の策定—」

業務主任者

（独）医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 部長心得 松山晃文
..... 5

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. 「ADMPC 細胞製剤の有用性の検証・検討に関する研究」

（独）医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 部長心得 松山晃文
同 難治性疾患治療開発・支援室 研究調整専門員 大倉華雪
..... 31

2. 「CPCでのコールドラン開始に関する研究

—原材料となる脂肪組織の特性と適格性に関して—

国立大学法人神戸大学医学研究科 形成外科学 特命准教授 一瀬晃洋
国立大学法人神戸大学医学研究科内科系講座 特命教授 青井貴之
..... 41

3. 「臨床試験（治験）プロトコール策定・薬事戦略相談

—再生医療等製品の治験実施体制整備に関して—

神戸国際フロンティアメディカルセンター 理事長・院長 田中紘一
（独）医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 部長心得 松山晃文
..... 57

4. 「臨床試験（治験）プロトコール策定・薬事戦略相談

—再生医療等製品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床試験の実施にかかる基本的考え方の提示に関して—

（独）医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 部長心得 松山晃文
..... 81

III. 学会等発表実績	93
IV. 研究成果の刊行物・別刷	99

I. 委託業務成果報告（総括）

脂肪組織由来多系統前駆細胞を用いた
抗炎症・肝線維溶解療法の開発に関する研究
—脂肪組織由来多系統前駆細胞試験物概要書の策定—

業務主任者 松山晃文（(独) 医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 部長心得）

研究要旨

肝硬変を対象疾患とし、経静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た。本研究の到達点は治験届 package 構築であり、これ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、試験物概要書として脂肪組織由来多系統前駆細胞試験物概要書を提示した。

A. 研究目的

本研究の到達点は治験届 package 構築であり、その一環として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

これ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

「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

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

四塩化炭素（CCl₄）による慢性肝炎モデルを用い、その肝線維化を組織学的に検討することで、本試験物の有効成分たるADMPCの有効性を検証することとした。四塩化炭素モデルの特徴は、その持続投与により慢性肝障害環境下にあること、本剤後も四塩化炭素投与を継続することで、炎症環境を維持することにある。(1, 2)

本モデルでは、ヒト由来細胞であるADMPCを投与するため、免疫不全動物を用いることとし、具体的にはNudeマウスを選択した。免疫不全状態は、NOD/SCIDマウスあるいはNOGマウスの方が厳しいものの、B細胞が欠損している場合は四塩化炭素投与による慢性肝障害が十分に評価できないと知られているためである。

8週齢のNudeマウスに四塩化炭素（0.3 mL/kg）を週2回、6週間（計12回）腹腔内投与し、慢性肝障害モデルを作製する（レシピエント）。これにADMPCを尾静脈より投与した。この後も四塩化炭素投与は同様に6週間継続し、肝組織をマッソン・トリクローム染色とシリウス・レッド染色を実施、

線維化の程度はシリウス・レッドにて染色される領域を線維化とし、組織面積に対するシリウス・レッド被染色領域の比率をもってADMPC投与・非投与対照群を比較評価した。コントロール群での線維化比率11%に対してADMPC投与群で2%と肝線維化が抑制されており、本試験物投与の有効性が示唆された。

2) 副次的薬理試験

副次的薬理試験の目的は、期待した治療標的に関連しない被験物質の作用もしくは効果の機序に関する試験である。当該作用は単回毒性試験にて観察しうると考え、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

当該試験の目的は単回毒性試験にて達しうると考え、本試験物を用いた安全性薬理試験は実施していない。

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) ADMPCのヌードラットを用いる単回投与毒性試験の予備試験（株式会社日本バイオリサーチセンターにて実施）

ADMPCを雄ヌードラットに 1.7×10^6 、 5.0×10^6 、 1.5×10^7 cells/kgを尾静脈内に単回投与した。対照は、生理食塩液を投与した。尾静脈内投与では、ADMPC各投与群とも死亡発現は認められず、一般状態、体重推移及び剖検所見に異常は認められなかった。最小致死量は、 1.5×10^7 cells/kg以上と考えら

れる。本試験の高用量は 1.5×10^7 cells/kg以上と考えられる。

2) ADMPCのヌードラットを用いる単回静脈内投与毒性試験 (GLP試験: 株式会社日本バイオリサーチセンターにて実施)

ADMPCを雌雄ヌードラットに 1.7×10^6 、 5.0×10^6 、 1.5×10^7 cells/kgを静脈内に1回投与した。投与後の観察期間は14日間とした。対照は、陰性対照としてリンゲル液を、媒体対照として3.3%ヘパリン加リンゲル液を投与した。ADMPC各投与群の雌雄とも死亡発現は認められず、一般状態、体重推移及び剖検に異常は認められなかった。最小致死量は、雌雄とも 1.5×10^7 cells/kg以上と考えられる。ADMPCの 1.5×10^7 cells/kgまでの単回静脈内投与では、一般状態、体重推移及び剖検に異常は認められず、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。

3) ラット脂肪組織由来多系統前駆細胞 (mlewrADMPC) のBrown Norwayラットにおける単回静脈内投与毒性試験のための予備試験 ((財) 食品薬品安全性センターにて実施)

脂肪組織由来多系統前駆細胞の同種医薬品としての安全性評価を目的として、ラットにおける単回静脈内投与毒性試験を実施するにあたり、投与量ならびに投与速度を設定することを目的に予備試験を実施した。観察は投与日を観察第1日として観察第4日まで行った。 2×10^6 cells/mLの被験細胞

(male Lewis rat由来ADMPC: mlewrADMPC) を20 mL/kg、合計3例の雌ラットに87.0 mL/hrの投与速度で投与した結果、一般状態の観察では、いずれの動物にも異常はみられず、観察最終日まで死亡は認められなかった。

また、観察期間中の体重も3例とも順調に推移した。病理学検査の結果、3例とも腎臓に両側性の腎盂の拡張が観察されたほか、2例で肺に暗色域あるいは暗色点がみられ、軽度であるが気腫様を呈していた。以上の結果から、 2×10^6 cells/mLのmlewrADMPCを20 mL/kgの容量、87.0 mL/hrの投与速度で投与しても、死亡を引き起こす可能性は少ないと考えられた。この試験の結果から本試験における投与容量を20 mL/kg、投与速度は87.0 mL/hrに設定した。

4) ラット脂肪組織由来多系統前駆細胞 (mlewrADMPC) のBrown Norwayラットにおける単回静脈内投与毒性試験 (GLP試験: (財) 食品薬品安全性センターにて実施)

脂肪組織由来多系統前駆細胞の同種医薬品としての安全性評価を目的として、Brown Norway系雌ラットに、同種異系統であるWistar Lewis雄ラット脂肪組織由来多系統前駆細胞 (以下、mlewrADMPC) あるいは、同種同系統であるBrown Norway系雄ラット脂肪組織由来多系統前駆細胞 (以下、mbnrADMPC) を単回静脈内投与し、2週間にわたって観察する毒性試験を実施した。 2×10^6 cells/mLのmlewrADMPC、mbnrADMPCあるいは媒体であるヘパリン加リンゲル液を、20 mL/kgの割合でそれぞれ10例ずつのBrown Norway系雌ラットに87.0 mL/hrの投与速度で投与し、観察は投与日を観察第1日として観察第15日まで行った。第15日に剖検した結果、腎臓の糸球体において限局的な塞栓が、肺においてはmbnrADMPC投与群で重量の増加、mbnrADMPC投与群およびmlewrADMPC投与群で肺実質内に肉芽組織が観察された。これらの所見から、静脈内に投与された細

胞は血流によって運ばれ、肺あるいは腎臓に定着した可能性が考えられた。一方、他の器官における組織像には、定着した細胞により引き起こされた毒性変化はみられなかった。その他、一般状態、体重、血液学的検査所見に毒性変化を伺わせる変化は認められなかった。

異個体異系統由来細胞投与により懸念される免疫反応については、胸腺、脾臓、下顎ならびに腸間膜リンパ節の組織には免疫異常を示唆する所見はなく、血中総タンパク量、アルブミン量および両者から算出されるグロブリン量、白血球数ならびに白血球百分率には変化はみられなかったことから、同種同系統および同種異系統由来の多系統前駆細胞の単回静脈内投与により、望ましくない免疫反応が生じる可能性は低いものと考えられた。

5) 造腫瘍試験 (GLP試験：(財) 食品薬品安全性センターにて実施)

ADMPC (ロット番号：081009M) (ロット番号：090420F) (ロット番号：070927F) を10匹のヌードマウスの皮下に107 個/匹接種し、85日間、造腫瘍性の有無を観察した結果、全例で腫瘍性増殖はみられなかった。また、試験系の確認のために陽性細胞としてヒト子宮頸部癌細胞 (HeLaS3) あるいは陰性細胞としてヒト胎児肺正常2倍体

(MRC-5) を接種する群を設定した。その結果、陽性細胞接種群の全例の接種部位皮下に腫瘍性増殖が認められた。一方、陰性細胞接種群の全例で腫瘍性増殖は認められなかった。本試験条件下ではADMPC (ロット番号：081009M) (ロット番号：090420F) (ロット番号：070927F) を接種することにより、腫瘍形成は認められなかった。従って、ADMPC (ロット番号：081009M) (ロ

ット番号：090420F) (ロット番号：070927F) は造腫瘍性を有さないことが明らかとなった。なお、本試験はWHO-TRS878の改定が行われる前に (財) 食品薬品安全性センターにて実施されたため、旧ガイドラインのもと行われている。

6) 軟寒天コロニー形成確認試験 (GLP試験：(財) 食品薬品安全性センターにて実施)

軟寒天コロニー形成試験を実施することにより、P5-ADMPC (ロット番号：070927 F) (ロット番号：081009 M) (ロット番号：090420 F) の形質転換の有無を評価した。被験細胞は凍結アンプルで受領後、解凍して2日間培養し、トリプシン処理して細胞を分散し、0.33%軟寒天培地にディッシュあたり 2×10^4 個播種した。3週間培養後に、コロニー数を数えて軟寒天培地におけるコロニー形成率を求めた。同時に、液体培地にディッシュあたり100細胞播種し、8日目に固定・染色してコロニー数を数えて液体培地におけるコロニー形成率を求めた。ロット番号：070927 Fでは、軟寒天培地および液体培地それぞれにおけるコロニー形成率から求めた軟寒天コロニー形成率は0%であり、陽性判定基準の1%以下であった。ロット番号：081009 Mでは、軟寒天培地および液体培地それぞれにおけるコロニー形成率から求めた軟寒天コロニー形成率は0%であり、陽性判定基準の1%以下であった。ロット番号：090420 Fでは、軟寒天培地および液体培地それぞれにおけるコロニー形成率から求めた軟寒天コロニー形成率は0.00167%であり、陽性判定基準の1%以下であった。以上の結果から、P5-ADMPC (ロット番号：070927 F) (ロット番号：081009 M) (ロット番号：090420 F) は、本試験条件下にお

いて、形質転換の指標の一つである足場非依存性を示さないと結論した。

7) 核型分析試験 (GLP試験：(財) 食品薬品安全性センターにて実施)

ADMPCの培養過程で、細胞の細胞遺伝学的性状に変化が認められるか否かを調べるために、3ロットのADMPC (ロット番号：070927 F) (ロット番号：090420 F) (ロット番号：081009 M) を3、5、8継代にて核型分析を行った。1ロットのADMPC (ロット番号：070927 F) については3、5、8継代にて核型分析が実施可能であったが、2ロットのADMPC (ロット番号：090420 F) (ロット番号：081009 M) については、8継代にて作製した標本にて分裂細胞が認められなかったため、標本観察は実施しなかった。3ロットで染色体数の最頻染色体数は46本であり、2ロット (ロット番号：070927 F) (ロット番号：090420 F) に関しては、その頻度は培養にて変化せず、培養工程で細胞遺伝学的性状に変化は生じていないと結論した。1ロット (ロット番号：081009 M) については、8継代での染色体数の観察はできなかったが、培養過程で染色体数の最頻染色体数は46本であるもののその頻度が低下しており、細胞遺伝学的性状の変化が生じているものの、これら3ロットでの造腫瘍試験は陰性であり、安全性にかかる問題はないと考えられる。

8) Comparative Genomic Hybridization (CGH)試験 (タカラバイオにて実施)

ADMPCの培養過程で、細胞の細胞遺伝学的性状に変化が認められるか否かを調べるために、3ロットのADMPC (ロット番号：070927 F) (ロット番号：090420 F) (ロット番号：081009 M) を3、5、8継代にてCGH

試験を実施した。核型分析にて細胞遺伝学的性状に変化を認めたロットを含む3ロットすべてで、3継代と5継代の比較、5継代と8継代の比較、および3継代と8継代の比較で、遺伝子の重複、欠損を認めなかった。

2.3 薬物動態及び薬物代謝

薬物動態に関しては、体内動態試験として実施することとしており、現在計画中である。

薬物代謝に関しては、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、当該試験は不要と判断した。またADMPCのヌードラットを用いた単回投与毒性試験、同種移植への外挿性を担保するラット同等製剤である脂肪組織由来多系統前駆細胞 (mlewrADMPC) のBrown Norwayラットにおける単回静脈内投与毒性試験においても、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、当該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。進行中の関連するクリニカルトライアルについて、ClinicalTrials.govを用い、検索ワードに肝硬変および細胞治療として調査した。非培養の骨髄由来単核球を肝硬変患者に投与する臨床研究に関しては、我が国で山口大学及び山形大学にて実施されている。骨髄も脂肪組織も間葉系組織であるが、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

非培養の骨髄由来単核球とは異なる。また金沢大学にて、肝硬変を対象とした脂肪組織由来間質細胞（非培養）を経肝動脈的投与あるいは経静脈的に投与する臨床研究が開始されている。なお、詳細は「1.4.6.脂肪組織由来多系統前駆細胞懸濁液による治療」を参照されたい。

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：脂肪組織由来多系統前駆細胞

1.2. 活性成分（本質）

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、健常ボランティア（ドナー）からの腹部皮下脂肪組織の提供を受け、当該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)を本質とする、ヒト（同種）由来細胞・組織加工医薬品に該当する。本試験物を肝硬変患者に経静脈的に投与することにより、肝硬変症における肝線維化の進行を抑制あるいは改善することが期待される。

ドナー腹部皮下脂肪組織採取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回収する。

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

肝硬変症

1.4.2. 概念・定義・病因・病態

肝硬変は、炎症による細胞の破壊と再生を繰り返した結果、病理組織学的に慢性の肝細胞の障害により線維性隔壁に囲まれた再生結節（偽小葉）が形成された肝障害の終末像である。本邦ではウイルス肝炎、特にC型肝炎ウイルス感染が原因の肝硬変の割合が最も高いが、最近ではメタボリックシンドロームに関連した非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の占める割合が少しずつ増加している。肝硬変は肝癌の発癌危険因子であり、その予防・治療法の開発などは非常に重要な課題である。

肝硬変であると診断するには、黄疸、腹水、肝性脳症などの肝不全症候を認める非代償性肝硬変では容易である。しかし、代償性肝硬変では自覚症状を認めないことも多く、その前段階である慢性肝炎との鑑別が重要であり、実際の臨床の場においては、進行した慢性肝炎なのか、初期の肝硬変（代償性肝硬変）であるのかを鑑別する

のはしばしば困難な場合があり、肝生検、腹腔鏡検査により初めて可能となる例も多い。

肝細胞が壊死・脱落を繰り返し、線維化が顕著となり隔壁形成が起り、再生結節が完成した状態、つまり肝硬変を、血液検査所見のみで診断することは困難である。慢性肝炎の進行した状態の判別、肝硬変の重症度、潜在性肝硬変の発見など、従来の古典的な検査とアミノ酸分画、線維化マーカー、胆汁酸など比較的新しい検査を組み合わせ、いかに組織をみなくても肝硬変が診断できるか総合的に診断を進めることとなる。

肝機能（AST(GOT)、ALT(GPT)等）は軽度異常であることが多く、肝硬変の程度をはかる指標にはならない。肝硬変の程度を測る指標としては、血清アルブミン濃度の低下、総ビリルビン濃度の上昇、プロトロンビン時間の延長、蛋白合成能を反映する非特異的コリンエステラーゼの低下がある。

他に、肝硬変に特有の検査として、肝臓の線維化マーカーであるヒアルロン酸やIV型コラーゲン7S、プロコラーゲンIIIペプチド(P-III-P)も用いられる。これらの異常は肝硬変であることを強く示唆する。排泄能の評価にはインドシアニンググリーン静注後15分の停滞率を測定することが多い（略号ICG₁₅）。そのほか、血液中の血小板数の減少（C型肝炎において肝線維化との相関が強い）、白血球減少、貧血の上昇を認める。

肝硬変の画像所見は、①肝自体の線維化に伴う形態変化、②肝硬変によってもたらされる血行動態変化（門脈圧亢進）に伴う画像所見、③肝機能低下によって起る画像所見に大別される。

1.4.3. 疫学

日本には40万人の肝硬変患者がおり、病因は60%がC型肝炎、15%がB型肝炎、12%がアルコール性、その他（ヘモクロマトーシス、ウイルソン病、原発性胆汁性肝硬変、Budd-Chiari症候群、うっ血性心不全）である。人口10万人あたりの死亡率は12.5人で、45-59歳の男性では死亡順位第4位である。

1.4.4. 標準治療と予後

治療のゴールは、(1)肝疾患の進展を遅らせる、あるいは治癒させること、(2)他の原因による肝臓障害を予防すること、(3)合併症の予防、(4)肝移植の時期を決定することである。肝炎に対する抗ウイルス治療に加え、生活管理、次いで薬物治療、肝移植である。

生活管理

肝臓は糖質、脂肪、タンパク質、アミノ酸およびエネルギー代謝の中心臓器であることから、肝硬変患者では低栄養状態（PEM）が高頻度に出現し、この状態が患者の予後、あるいはQOLに影響を及ぼす。したがって、肝硬変における栄養代謝について理解したうえで、患者の栄養状態を評価し、適正な栄養療法や運動療法を選択・実施することとなる。

薬物治療・選択基準

肝硬変は臨床的に、代償性（期）と非代償性（期）とに分けられ、黄疸、腹水、浮腫、肝性昏睡、消化管出血などの徴候のある非代償性肝硬変では積極的な薬物療法が必要となる。薬物投与に際しては、必ずしも欧米の基準があてはまらないこともあり、症例ごとに臨床兆候や血液生化学検査値を参考に投与量を加減する。また、肝予備能の低下例では薬物療法の効果に限界がある

ことに留意し、タイミングを逸することなく治療を開始することが重要である。

腹水治療

肝硬変の腹水出現は低タンパク血症、門脈圧亢進症、内分泌異常、循環動態異常などの病態が複雑に絡み合っている。最初の治療は塩分制限、利尿薬でのコントロールとなる。しかし、利尿薬を投与しても効果がない症例、利尿薬の副作用により投与制限を必要とする症例といった難治性腹水に対しては別の治療が必要となる（腹水穿刺＋アルブミン静注、TIPS, Denver型シャント、肝移植など）。

高アンモニア血症治療

肝硬変における高アンモニア血症治療の目的は、肝性脳症の予防ならびに進展の阻止にある。治療においては昏睡度、誘因、臨床病型や肝細胞障害の程度を考慮して行うが、アンモニアの産生抑制とアミノ酸代謝異常などの是正が基本方針であり、誘因除去や食事・栄養管理などの一般療法と並行して行う。

門脈圧亢進症の薬物療法

門脈圧亢進は肝内血管抵抗の上昇と門脈血流量の増加によって生じる。また、肝内血管抵抗の上昇には組織的要因と動態的要因がある。組織的要因による肝内血管抵抗上昇を改善する薬剤には、インターフェロンやアンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬などがあり、動態的要因による肝内血管抵抗上昇を改善する薬剤には亜硝酸製剤やプラズミンなどがある。門脈血流量を減少し門脈圧を低下させる薬剤には、バソプレシン、プロプラノロールなどがあり、食道静脈瘤の治療に広く用いられている。

肝移植

肝硬変は非可逆性慢性肝不全の病態を呈すると肝移植の適応となる。ウイルス性肝

硬変と非ウイルス性肝硬変では、その肝移植の成績は異なる。臨床的な問題点としては、いつの時点で肝移植のインフォームド・コンセント（IC）を得ることが必要なのか、そして肝移植の適切な実施時期がいつなのかの2点に集約されると考えられる。

術前、術後の抗ウイルス療法、原因疾患にもよるものの、肝硬変一般にはChild-Pugh分類のカテゴリーAで将来的な肝移植の必要性のICを得る努力を行い、Child-Pugh分類のカテゴリーBもしくはCで適応時期と考え、具体的にはMELDスコア

(<http://optn.transplant.hrsa.gov/resources/MeldPeldCalculator.asp?index=98>)の20点までの実施が肝移植の予後を考えた点で望ましい。

代償性肝硬変の診断後の平均生存期間は7～10年で、診断後2～5年間はほぼ100%生存するが、合併症発症後の2生率は50%未満である。代償期から非代償期への移行は年率5～10%である。B型肝炎ウイルス(HBV)代償性肝硬変の5生率は80～85%で、非代償期になると1生率は55～70%、5生率は14～28%に落ち込む。C型肝炎ウイルス(HCV)代償性肝硬変の5、10生率はそれぞれ91%、79%で、肝癌発生率は我が国では5～7%と極めて高い。大酒家非代償性肝硬変が飲酒を続けると5生率は30%未満と禁酒時の1/2となる。

非代償性肝硬変の併存疾患として糖尿病が知られている。非代償性肝硬変で生じる合併症としては、腹水、食道静脈瘤、肝性脳症、肝細胞癌が挙げられる。腹水は、肝臓におけるアルブミン合成低下による血液浸透圧の低下と、門脈圧亢進による腸管膜の血管内圧の上昇とがあいまって、血漿成分が腹腔内に漏出したものである。自覚症

状としての腹部膨満感のみならず、突発性細菌性腹膜炎の原因ともなる。食道静脈瘤は、肝硬変が進行し、側副血行路である左胃静脈血流の増加により、左胃静脈が食道内腔に瘤を形成したものである。破裂による出血は、肝硬変の死亡原因の一つである。肝性脳症は、腸管内に発生した神経毒作用を有するアンモニアが、肝機能不全により代謝できず、その神経毒性によって、昏睡、異常行動、興奮などが惹起されたものである。肝硬変は、肝細胞癌の発生母地となり、肝細胞癌は合併症として重要な位置を占める。

1.4.6. 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

四塩化炭素 (CCl₄) による肝細胞直接障害モデルを用い、その肝線維化を組織学的に検討することで、本試験物の有効成分たる ADMPC の有効性を検証することとした。四塩化炭素モデルの特徴は、その持続投与により慢性肝障害環境下にあること、ADMPC 移植後も四塩化炭素投与を継続することで、炎症環境を維持することにある。

本モデルでは、ヒト由来細胞である ADMPC を投与するため、免疫不全動物を用いることとし、具体的には Nude マウスを選択した。免疫不全状態は、NOD/SCID マウスあるいは NOG マウスの方が厳しいものの、B 細胞が欠損している場合は四塩化炭素投与による慢性肝障害が十分に評価できないとの報告があるためである。

8週齢の Nude マウスに四塩化炭素 (0.3 mL/kg) を週2回、6週間 (計12回) 腹腔内投与し、慢性肝障害モデルを作製する (レシピエント)。これに ADMPC を尾静脈より

投与した。

この後も四塩化炭素投与は同様に6週間継続した。採血にて血中 Albumin、AST、ALT および T-Bil 値を測定比較するとともに、肝組織をマッソン・トリクローム染色とシリウス・レッド染色を実施、線維化の程度はシリウス・レッドにて染色される領域を線維化とし、組織面積に対するシリウス・レッド被染色領域の比率をもって ADMPC 投与・非投与対照群を比較評価した。なお、マッソン・トリクローム染色では、線維は青色に染色され、シリウス・レッド染色では線維は赤色で染色される。

Albumin 値に差は認められなかったが、肝逸脱酵素である AST および ALT は ADMPC 投与群で抑制されており、解毒の指標の一つである総ビリルビン値も抑制されていた。

以上のように、今回用いた四塩化炭素慢性肝障害モデルでは、コントロール群での線維化比率 11% に対して ADMPC 投与群で 2% と肝線維化が抑制されており、本試験物投与の有効性が示唆された。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。進行中の関連するクリニカルトライアルについて、[CrinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) を用い、検索ワードに肝硬変および細胞治療として調査した (平成24年11月現在)。

1.4.7. 本治験実施が可能であると判断した理由

本試験物は、慢性肝炎モデルにおいて肝線維化の抑制、血中 ALT、ビリルビン値の改善を認め、有効性は検証されている。

加えて、健常ヌードラットを用いた単回投与毒性試験、同種細胞投与への外挿性を確保した脂肪組織由来多系統前駆細胞

(mlewrADMPC)のBrown Norwayラットにおける単回静脈内投与毒性試験において、本試験物および動物由来同等試験物投与に起因する全身への影響は認められず、安全性に関しても担保されている。

以上のような非臨床研究の結果を踏まえ、治験の実施は可能と考えられた。

1.5. 予期される予防的、治療的又は診断的適応

肝硬変患者における肝線維化進行の抑制あるいは改善

1.6. 被験薬を評価する上で留意すべき全般的事項

(1) 肺梗塞の危険性について

投与医療機関にて投与医師により融解投与されるため、懸濁を十分に行うように指導する。

(2) 感染性物質に対する安全性について

本試験物の原料である同種脂肪組織、製造工程中で使用している生物由来原料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、本治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

不適合の項目があることが判明した場合には、本試験物は出荷しない。

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. 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) 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。

4) Viability

剥離した細胞をトリパンブルーにて染色し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。

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、レトロネクチン、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 γ 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. 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

四塩化炭素 (CCl₄) による肝細胞直接障害モデルを用い、その肝線維化を組織学的に検討することで、本試験物の有効成分たる ADMPC の有効性を検証することとした。四塩化炭素モデルの特徴は、その持続投与により慢性肝障害環境下にあること、ADMPC 移植後も四塩化炭素投与を継続することで、炎症環境を維持することにある。

本モデルでは、ヒト由来細胞である ADMPC を投与するため、免疫不全動物を用いることとし、具体的には Nude マウスを選択した。免疫不全状態は NOD/SCID マウスあるいは NOG マウスの方が厳しいものの、B 細胞が欠損している場合は四塩化炭素投与による慢性肝障害が十分に評価できないとの報告があるためである (JCI. 2005)。

8週齢の Nude マウスに四塩化炭素 (0.3 mL/kg) を週2回、6週間 (計12回) 腹腔内投与し、慢性肝障害モデルを作製する (レシピエント)。これに ADMPC を尾静脈より投与した。

この後も四塩化炭素投与は同様に6週間継続した。採血にて血中 Albumin、AST、ALT および T-Bil 値を測定比較するとともに、肝組織をマッソン・トリクローム染色とシリウス・レッド染色を実施、線維化の程度はシリウス・レッドにて染色される領域を線維化とし、組織面積に対するシリウス・レッド被染色領域の比率をもって ADMPC 投与・非投与対照群を比較評価した。なお、

マッソン・トリクローム染色では、線維は青色に染色され、シリウス・レッド染色では線維は赤色で染色される。

Albumin値に差は認められなかったが、肝逸脱酵素であるASTおよびALTはADMPC投与群で抑制されており、解毒の指標の一つである総ビリルビン値も抑制されていた。

以上のように、今回用いた四塩化炭素慢性肝障害モデルでは、コントロール群での線維化比率11%に対してADMPC投与群で2%と肝線維化が抑制されており、本試験物投与の有効性が示唆された。

3) 副次的薬理試験

単回投与毒性試験において毒性が出現していないため、本試験物の副次的薬理試験は実施していない。

4) 安全性薬理試験

単回投与毒性試験において毒性が出現していないため、本試験物の安全性薬理試験は実施していない。

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。

3.2. 毒性

3.2.1. 要約

本試験物の安全性を担保するため、1)本試験物を健常ヌードラットに、2)本試験物のラット類似細胞として Lewis rat から ADMPC を調製し、syngenic として Lewis rat, allogenic として Norway rat に、各々経尾静脈的に投与し、その全身毒性の発現について、単回投与毒性用量設定試験および単回投与毒性試験にて検討した。単回投与毒性用量設定

試験は各々日本バイオリサーチ(株)と(財)食品薬品安全性センターにて、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、単回投与毒性試験に関しては各々の施設でGLP適合にて実施した。なお、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。

ADMPC の培養過程で、細胞の細胞遺伝学的性状に変化が認められるか否かを調べるために、3ロットのADMPCを3、5、8継代にて核型分析を行った。1ロットでは3、5、8継代に核型異常を認めなかった。一方、2ロットでは3、5継代では核型異常を認めず、8継代では細胞増殖速度の低下により分裂中期像を得られず、解析は不能であった。この2ロットのうち1つのロットで解析できた3および5継代で核型異常を認めた。異常比率に差はなく、CGH解析にて差を認めないこと、当該試料が胃がん患者の体網脂肪組織由来であることから、培養の工程で核型異常が生じたものではないと判断した。

軟寒天コロニー形成確験認試では、3ロットのADMPCは形質転換の指標の一つである足場非依存性を示さなかった。

一般的に、間葉系細胞では通常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⁵⁾、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⁶⁾、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⁵⁾、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⁷⁻⁹⁾、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¹⁰⁻¹³⁾。これらのことを総合的に考え合わせ、本細胞が腫瘍化するリスクは極めて低いと考えられるものの、造腫瘍試験を3ロットのADMPCについて実施した。ADMPCを10匹のヌードマウスの皮下に 10^7 個/匹接種し、85日間、造腫瘍性の有無を観察した結果、全例で腫瘍性増殖はみられないとの結果が、3ロットすべてで得られた。このことより、ADMPCは造腫瘍性を有さないことが明らかとなった。なお、本試験はWHO-TRS878の改定が行われる前に（財）食品薬品安全性センターにて実施されたため、旧ガイドラインのもと行われている。

また、自己細胞である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。

3.2.2.ヌードラットを用いた全身毒性試験

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、本試験物を健常ラットに経尾静脈的に投与し、その全身毒性の発現について評価することとした。

1) ADMPCのヌードラットを用いる単回投与毒性試験の予備試験

ADMPCを雄ヌードラットに 1.7×10^6 、 5.0×10^6 、 1.5×10^7 cells/kgを尾静脈内に単回投与した。1群の動物数は5匹とした。対照は、

生理食塩液を投与した。

尾静脈内投与では、ADMPC各投与群とも死亡発現は認められず、一般状態、体重推移及び剖検所見に異常は認められなかった。最小致死量は、 1.5×10^7 cells/kg以上と考えられる。本試験の高用量は 1.5×10^7 cells/kg以上と考えられる。

2) ADMPCのヌードラットを用いる単回静脈内投与毒性試験 (GLP試験)

ADMPCを雌雄ヌードラットに 1.7×10^6 、 5.0×10^6 、 1.5×10^7 cells/kgを静脈内に1回投与した。1群の動物数は雌雄各5匹とし、投与後の観察期間は14日間とした。対照は、陰性対照としてリンゲル液を、媒体対照として3.3%ヘパリン加リンゲル液を投与した。

ADMPC各投与群の雌雄とも死亡発現は認められず、一般状態、体重推移及び剖検に異常は認められなかった。最小致死量は、雌雄とも 1.5×10^7 cells/kg以上と考えられる。

以上の如く、ADMPCの 1.5×10^7 cells/kgまでの単回静脈内投与では、一般状態、体重推移及び剖検に異常は認められず、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。

3) ラット脂肪組織由来多系統前駆細胞 (mlewrADMPC) のBrown Norwayラットにおける単回静脈内投与毒性試験のための予備試験

脂肪組織由来多系統前駆細胞の医薬品としての安全性評価を目的として、ラットにおける単回静脈内投与毒性試験を実施するにあたり、投与量ならびに投与速度を設定することを目的に予備試験を実施した。

観察は投与日を観察第1日として観察第4日まで行った。 2×10^6 cells/mLの被験細胞 (male Lewis rat 由来 ADMPC:

mlewrADMPC) を 20 mL/kg、合計 3 例の雌ラットに 87.0 mL/hr の投与速度で投与した結果、一般状態の観察では、いずれの動物にも異常はみられず、観察最終日まで死亡は認められなかった。また、観察期間中の体重も 3 例とも順調に推移した。病理学検査の結果、3 例とも腎臓に両側性の腎盂の拡張が観察されたほか、2 例で肺に暗色域あるいは暗色点がみられ、軽度であるが気腫様を呈していた。

以上の結果から、 2×10^6 cells/mL の mlewrADMPC を 20 mL/kg の容量、87.0 mL/hr の投与速度で投与しても、死亡を引き起こす可能性は少ないと考えられた。この試験の結果から本試験における投与容量を 20 mL/kg、投与速度は 87.0 mL/hr に設定した。

4) ラット脂肪組織由来多系統前駆細胞

(mlewrADMPC) の Brown Norway ラットにおける単回静脈内投与毒性試験 (GLP 試験)

脂肪組織由来多系統前駆細胞の医薬品としての安全性評価を目的として、Brown Norway 系雌ラットに、同種異系統である Wistar Lewis 雄ラット脂肪組織由来多系統前駆細胞 (以下、mlewrADMPC) あるいは、同種同系統である Brown Norway 系雄ラット脂肪組織由来多系統前駆細胞 (以下、mbnrADMPC) を単回静脈内投与し、2 週間にわたって観察する毒性試験を実施した。

2×10^6 cells/mL の mlewrADMPC、mbnrADMPC あるいは媒体であるヘパリン加リンゲル液を、20 mL/kg の割合でそれぞれ 10 例ずつの Brown Norway 系雌ラットに 87.0 mL/hr の投与速度で投与し、観察は投与日を観察第 1 日として観察第 15 日まで行った。

第 15 日に剖検した結果、腎臓の糸球体に

おいて限局的な塞栓が、肺においては mbnrADMPC 投与群で重量の増加、mbnrADMPC 投与群および mlewrADMPC 投与群で肺実質内に肉芽組織が観察された。これらの所見から、静脈内に投与された細胞は血流によって運ばれ、肺あるいは腎臓に定着した可能性が考えられた。

一方、他の器官における組織像には、定着した細胞により引き起こされた毒性変化はみられなかった。その他、一般状態、体重、血液学的検査所見に毒性変化を伺わせる変化は認められなかった。

異個体由来細胞投与により懸念される免疫反応については、胸腺、脾臓、下顎ならびに腸間膜リンパ節の組織には免疫異常を示唆する所見はなく、血中総タンパク量、アルブミン量および両者から算出されるグロブリン量、白血球数ならびに白血球百分率には変化はみられなかったことから、同種同系統および同種異系統由来の多系統前駆細胞の単回静脈内投与により、望ましくない免疫反応が生じる可能性は低いものと考えられた。

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³⁾。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³⁾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、GLP 下にて当該試験を実施した。

軟寒天コロニー形成試験を実施することにより、P5-ADMPC (ロット番号:070927 F) (ロット番号:081009 M) (ロット番号:090420 F) の形質転換の有無を評価した。被験細胞は凍結アン