

平成19年度

次世代医療機器評価指標作成事業

再生医療（細胞シート）審査WG報告書

再生医療（細胞シート）審査WG座長

東京歯科大学市川総合病院

角膜センター

篠崎 尚史

目次

I. 次世代医療機器評価指標作成検討会再生医療審査WG委員名簿

II. 平成19年度WG会議議事概要

III. 細胞シート評価指標

重症心不全細胞治療用細胞シート評価指標（案）

角膜上皮細胞シート評価指標（案）

培養上皮細胞シート作製のための温度応答性培養皿について

IV. 調査事項

1. 心筋再生に関して

1-1. 自己培養骨格筋芽細胞シート移植による拡張型心筋症の再生治療

澤 芳樹

1-2. 心臓幹細胞 Cardiac Stem Cell

浅原 孝之

2. 角膜内皮に関して

2-1. 角膜内皮の海外およびわが国の研究開発状況と国内外における産業化の状況

西田 幸二

2-2. 角膜内皮再生を目指した細胞および細胞シート移植
-角膜内皮再生の最先端と今後の発展性-

山上 聡

2-3. 角膜内皮細胞治療の必要性和国内外での患者予測数

木下 茂

3. 再生医療製品の開発に関わる企業の立場から評価指標への要望など

3-1. 次世代評価指標（再生）について

テルモ株式会社

3-2. これまでの経験とそれに基づく細胞シート評価指標策定及び審査指標に関する意見及び要望

株式会社セルシード

3-3. 実用化促進のための審査指標に対する要望等

アルプラスト株式会社

3-4. 角膜再生に期待する評価指標

株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング

V. 参考資料

1. ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針
2. 免疫不全マウスにおける腫瘍細胞の生着性の比較

土屋利江

I. 次世代医療機器評価指標作成検討会再生医療審査 WG 委員名簿（敬称略）

座長

篠崎尚史 東京歯科大学 市川総合病院角膜センター センター長

委員（五十音順）

岡野栄之 慶應義塾大学 医学部 生理学教室 教授

菊池明彦 東京理科大学 基礎工学部 材料工学科 准教授

永谷憲歳 国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 再生医療部長

西田幸二 東北大学医学部付属病院眼科 教授

松山晃文 大阪大学 医学部付属病院未来医療センター 准教授

厚生労働省

俵木登美子 厚生労働省 医療機器審査管理室 室長

柳沼 宏 厚生労働省 医療機器審査管理室 専門官

有川 仁 厚生労働省 医療機器審査管理室 係長

田中俊博 厚生労働省 医療機器審査管理室 指導官

梅垣昌士 厚生労働省 医政局研究開発振興課
ヒト幹細胞臨床研究対策専門官

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構

鹿野真弓 医薬品医療機器総合機構 生物系審査第二部 部長

新見裕一 医薬品医療機器総合機構 品質管理部 部長

末岡明伯 医薬品医療機器総合機構 品質管理部 基準課

国立医薬品食品衛生研究所（事務局）

土屋利江 国立医薬品食品衛生研究所 療品部 部長

澤田留美 国立医薬品食品衛生研究所 療品部 主任研究官

加藤玲子 国立医薬品食品衛生研究所 療品部 研究員

II. 平成 19 年度 WG 会議議事概要

次世代医療機器評価指標策定事業再生医療（細胞シート）審査 WG 平成 19 年度第一回会議議事録（概要）

1. 開催日時： 2007 年 10 月 11 日（木） 14 時～16 時
2. 開催場所： 国立医薬品食品衛生研究所 第 2 会議室
3. 出席者（敬称略）
委員：篠崎尚史（東京歯科大学）、松山晃文（大阪大学）、菊池明彦（東京理科大学）、
大西俊介（永谷委員代理）（国立循環器病センター研究所）
厚生労働省（医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室）：俵木登美子、柳沼宏、
有川 仁、田中俊博
事務局（国立医薬品食品衛生研究所）：土屋利江、澤田留美、加藤玲子
オブザーバー：田口隆久（産業技術総合研究所）、本間一弘（産業技術総合研究所）、
末岡明伯（医薬品医療機器総合機構）
4. 配布資料
 1. 平成 19 年度第一回委員会議事次第
 2. 平成 19 年度委員名簿
 3. 平成 18 年度 第三回委員会議事概要
 4. 第 6 回次世代医療機器評価指標検討会（厚生労働省）／医療機器開発ガイドライン評価検討委員会（経済産業省）合同検討会議事概要
 5. 合同検討会用資料（再生医療 WG）
 6. 評価指標素案作成用資料
 - 1. 細胞シート製造過程について
 - 2. 臨床段階（移植後、有効性など）について
 - 3. 骨格筋芽細胞シート作製のための温度応答性培養皿
 - 4. 細胞シート調製のための多孔性温度応答性培養皿の調製
5. 議事内容
 - ①平成 19 年度の座長及び委員が事務局より紹介された。委員は下記の通り。（敬称略）
座長：篠崎尚史 東京歯科大学 市川総合病院角膜センター センター長
委員：岡野栄之 慶應義塾大学 医学部 生理学教室教授

永谷憲歳 国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 再生医療
部長

西田幸二 東北大学医学部附属病院眼科 教授

松山晃文 大阪大学 医学部附属病院未来医療センター 准教授

菊池明彦 東京理科大学 基礎工学部 材料工学科 准教授

- ②平成18年度 第三回委員会会議議事録（概要）について事務局より報告された。
- ③第6回次世代医療機器評価指標検討会（厚生労働省）／医療機器開発ガイドライン評価検討委員会（経済産業省）合同検討会の内容について合同検討会委員の土屋利江氏より報告された。
- ④医薬発第1314号の見直しの現状について厚生労働省 医療機器審査管理室の俵木登美子氏より説明がなされた。
- ⑤平成19年度の活動方針について
- ・平成16年度より検討を続けていた心筋再生を目指した細胞シートの評価指標素案を今年度中に完成させることで合意した。
 - ・角膜用細胞シートの現状把握と評価指標素案作成に関する方針について検討した。
 - ・作成した評価指標素案と医薬発第1314号の改訂版との照らし合わせ方について検討した。
- ⑥評価指標素案作成に関する作業分担について
- | | | | |
|---------------------|---|-----------|--------|
| ・心筋用細胞シート | — | 松山委員、永谷委員 | } 岡野委員 |
| ・角膜用細胞シート | — | 篠崎座長、西田委員 | |
| ・温度応答性培養皿 (NAIPPAm) | — | 菊池委員 | |
- ⑦評価指標素案作成に関する作業予定について
- ・心筋用細胞シート及び温度応答性培養皿 (NAIPPAm) については、各委員作成の素案について第二回以降の会議において議論し、今年度末を目処に完成させる。
 - ・角膜用の細胞シートについては、第二回会議において臨床現場における現状の把握と評価指標素案作成に関する今年度における作業内容について決定し、第三回目以降の会議において作業を進める。
- ⑧今後の会議日程

第二回会議 : 平成19年11月20日(火) 14時~16時

第三回会議 : 平成19年12月17日(月) 14時~16時

第四回会議 : 平成20年1月16日(水) 14時~16時

於 : 国立医薬品食品衛生研究所 第二会議室

次世代医療機器評価指標策定事業再生医療（細胞シート）審査WG
平成19年度第二回会議議事録（概要）

1. 開催日時： 2007年11月20日（木） 14時～16時
2. 開催場所： 国立医薬品食品衛生研究所 第2会議室
3. 出席者（敬称略）

委員：篠崎尚史（東京歯科大学）、永谷憲歳（国立循環器病センター研究所）、西田幸二（東北大学）、松山晃文（大阪大学）
医薬品医療機器総合機構：鹿野真弓（生物系審査第二部）
厚生労働省：田中俊博（医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室）、梅垣昌士（医政局研究開発振興課）
事務局（国立医薬品食品衛生研究所）：土屋利江、澤田留美、加藤玲子
オブザーバー：田口隆久（産業技術総合研究所）
4. 配布資料
 1. 平成19年度第二回会議議事次第
 2. 平成19年度第一回会議議事録（概要）
 3. ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の製造管理・品質管理の考え方（案）
 4. 評価指標素案（心筋再生）作成用資料
 - 1. 細胞シート製造過程について
 - 2. 臨床段階（移植後、有効性など）について
 - 3. 骨格筋芽細胞シート作製のための温度応答性培養皿
 - 4. 細胞シート調製のための多孔性温度応答性培養皿の調製
5. 議事内容
 - ①平成19年度の新委員として、東北大学大学院医学系研究科西田幸二教授及び（独）医薬品医療機器総合機構生物系審査第二部鹿野真弓部長が座長より紹介され、各委員が挨拶された。
 - ②平成19年度 第一回委員会会議議事録（概要）について事務局より報告された。
 - ③評価指標素案（心筋再生を目指した細胞シート）の作成にあつての現況及び問題点等について松山晃文委員（大阪大学医学部付属病院未来医療センター）より説明がなされた。その後、座長及び委員でその内容等について討議され、評価指標素案（心筋再生を目指した細胞シート）作成の方向性について確認された。また最終的な文書化に当たってメール等を利用して委員間で相談して進めていく事で合意した。

④「角膜の再生医療の現状と展望」について、西田幸二委員（東北大学大学院医学系研究科）より発表され、その後発表内容についての質疑応答がなされた。

⑤評価指標素案（角膜再生を目指した細胞シート）の作成にあたって、その方向性について議論された。特に、対象を auto のみとするのかそれとも allo についても言及していくのかについて、臨床、医薬品医療機器総合機構、厚生労働省それぞれの立場からの見解を踏まえて討議された。

⑥今後の会議日程

第三回会議 : 平成 19 年 12 月 17 日 (月) 14 時～16 時

第四回会議 : 平成 20 年 1 月 16 日 (水) 14 時～16 時

於 : 国立医薬品食品衛生研究所 第二会議室

次世代医療機器評価指標策定事業再生医療（細胞シート）審査WG
平成19年度第三回会議議事録（概要）

1. 開催日時： 2007年12月17日（木） 14時～16時

2. 開催場所： 国立医薬品食品衛生研究所 第2会議室

3. 出席者（敬称略）

委員：篠崎尚史（東京歯科大学）、西田幸二（東北大学）、菊池明彦（東京理科大学）、
松山晃文（大阪大学）、大西俊介（永谷委員代理）（国立循環器病センター研
究所）

医薬品医療機器総合機構：鹿野真弓（生物系審査第二部）、末岡明伯（品質管理部）
厚生労働省（医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室）：

俵木登美子、柳沼宏、有川仁

事務局（国立医薬品食品衛生研究所）：土屋利江、澤田留美、加藤玲子

オブザーバー：本間一弘、田口隆久（産業技術総合研究所）

4. 配布資料

1. 平成19年度第三回会議議事次第

2. 平成19年度第二回会議議事録（概要）

当日配布：角膜上皮細胞シート（西田委員提供）

5. 議事内容

①平成19年度 第二回委員会会議議事録（概要）について事務局より報告された。

②再生医療（細胞シート）審査WGにおける評価指標素案作成にあたっての考え方について、厚生労働省医薬食品局医療機器審査管理室室長の俵木登美子氏より下記のような説明がなされた。

・平成12年に示された「1314号通知」について現在見直し作業が進められているが、この通知は再生医療に使われる細胞組織加工製品全般についての安全性と品質についての評価項目をリストしたもので、いろいろな細胞を対象としており、評価すべきポイントについては全て網羅するような形でまとめている。

・本WGで作成する評価指標については心筋、角膜それぞれに特化して「1314号通知」をフォローしていく。

・心筋については、どういう評価項目でどういう非臨床の動物試験を行うのが適切なのか、臨床評価としてどういった評価を行うのが適切なのかなど、特に心筋に

特化した留意点を中心にまとめる。そして全体としては「1314号通知」を参考に
する旨、前文として書く。

・「1314号通知」にプラスして特化して書いておくべきものという考え方でもう一
回整理しようと考えている。その作業については厚生労働省と医薬品医療機器総
合機構とで協議をしつつ案を提示する予定。

・角膜についての考え方は心筋と同様で、共通事項については「1314号通知」の
記載に任せ、角膜に特化した部分を上乘せしたような評価指標を作っていく。

・温度応答性培養皿そのものについての評価指標は、現段階で特化した評価指標を
作るの難しいと考える。従って本WGの報告書の中に位置づけてほしい。

その後、医薬品医療機器総合機構生物系審査第二部部長鹿野真弓氏より、心筋につ
いては細胞シートに限定しているのか、心筋に適用するような細胞製品全般（例え
ばシングルセル等）も想定されているのかとの質問があり、最終的に細胞製品全般
を想定した評価項目の作成を目指す方向で同意し、松山晃文委員（大阪大学医学部
附属病院未来医療センター）がまとめることとなった。

③評価指標素案（角膜再生を目指した細胞シート）の作成について西田幸二委員（東
北大学大学院医学系研究科）より説明がなされた。その後、座長及び委員でその内
容等について討議され、評価指標素案（角膜再生を目指した細胞シート）作成の方
向性について確認された。

④今年度は心筋再生と角膜再生に関する専門家に調査を依頼し、その内容を本WGの
報告書内でまとめることで合意した。調査は下記の専門家に依頼する予定。

・心筋再生に関して 大阪大学 澤 芳樹 先生

東海大学医学部など 浅原 孝之 先生

・角膜内皮に関して 東北大学 西田幸二 先生

東京大学 山上 聡 先生

京都府立医科大学 木下 茂 先生

・角膜再生に関する問題点、有害事象など 東北大学 西田幸二先生

・再生医療製品の開発に関わる企業の立場から評価指標への要望など テルモ(株)

アルプラスト(株)

(株)セルシード

(株)J-TEC

⑤今後の会議日程

第四回会議 : 平成20年1月16日(水) 14時~16時

於 : 国立医薬品食品衛生研究所 第二会議室

次世代医療機器評価指標策定事業再生医療（細胞シート）審査WG
平成19年度第四回会議議事録（概要）

1. 開催日時： 2007年1月16日（水） 14時～16時
2. 開催場所： 国立医薬品食品衛生研究所 第2会議室
3. 出席者（敬称略）

委員：篠崎尚史（東京歯科大学）、西田幸二（東北大学）、永谷憲歳（国立循環器病センター研究所）、菊池明彦（東京理科大学）、菰田弘（松山委員代理）（大阪大学）

厚生労働省（医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室）：俵木登美子、柳沼宏、有川仁

事務局（国立医薬品食品衛生研究所）：土屋利江、澤田留美、加藤玲子

オブザーバー：本間一弘、廣瀬志弘（産業技術総合研究所）
4. 配布資料
 1. 平成19年度第四回会議議事次第
 2. 平成19年度第三回会議議事録（概要）
 - 3-1. ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針（案）
 - 3-2. ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の製造管理・品質管理の考え方（案）当日配布：心筋再生用細胞シート（松山委員提供）
5. 議事内容
 - ①平成19年度 第三回委員会会議議事録（概要）について事務局より報告された。
 - ②平成19年度に行う各専門家への研究調査（心筋再生に関して2名、角膜再生に関して3名、企業の立場から4社）の依頼についての現況報告が事務局よりなされた。
 - ③「1314号通知」改訂の内容について厚生労働省医薬食品局医療機器審査管理室長俵木登美子氏より説明がなされた。特に、パブリック・コメント後に変更された点を中心に説明された。具体的には、「抗生物質」「製造工程」「最終製品の品質管理法」「エンドトキシン」「ウイルス試験」の項目等についての変更内容を示された。その上で、この「1314号通知」改訂版では、どのような細胞・組織に対しても注意すべき事が網羅的に書いてあるため、本WGで作成する評価指標素案には心筋または角膜再生を目指した細胞シートを作製する際の特異的な安全性関連項目を挙げていただきたいとの要望があった。

- ④評価指標素案（心筋再生を目指した細胞シート）の最新案（松山委員作成）について、大阪大学医学部附属病院未来医療センターの菰田弘氏（松山委員代理）より説明がなされた。その後その内容について精査された。特に「安全性検討項目」の「（1）腫瘍原性に関する検討」の内容について話し合われた。「1314号通知」改訂版との兼ね合いからも本評価指標素案においては「項目」としては入れるべきであるが具体的な方法の明記は避けた方がよいのではないかとの意見が出た。その他、「（2）催不整脈性に関する検討」や「有効性検討事項」、「治験プロトコール」についてそれぞれ意見が出て、いくつか修正を施す方向で同意した。
- ⑤「1314号通知」改訂版（案）となる資料3-1（ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針（案））との整合性をとった上で、評価指標素案（心筋再生を目指した細胞シート）の最終案作成を松山委員に、評価指標素案（角膜再生を目指した細胞シート）の最終案作成を西田委員にお願いし、1月中を目処に医薬品医療機器総合機構生物系審査第二部部长鹿野真弓氏へ送り、鹿野氏のチェックを経て最終的に厚生労働省医薬食品局医療機器審査管理室での検討が行われる事が確認された。
- ⑥温度応答性培養皿そのものについての評価指標は、現段階で特化した評価指標を作成するのは難しいため、本WGの報告書の中に情報提供という形で掲載することで一同同意した。
- ⑦3月24日に予定されている合同検討会までに上記の評価指標素案及び研究調査結果をある程度まとめる事が確認された。

細胞シート評価指標

重症心不全細胞治療用細胞シート評価指標（案）

角膜上皮細胞シート評価指標（案）

培養上皮細胞シート作製のための温度応答性培養皿について

重症心不全細胞治療用細胞シート評価指標（案）

はじめに

1. 本ガイドラインの対象
2. 用語の定義
3. 細胞・組織医薬品等の製造工程及び品質管理について
細胞シート製品の品質管理上の留意点
4. 非臨床評価について
 - (1) 安全性の評価
 - (2) 有効性の評価
5. 臨床評価について

重症心不全細胞治療用細胞シート評価指標（案）

はじめに

ヒト由来細胞・組織を加工した医薬品又は医療機器（以下「細胞・組織加工医薬品等」という。）の品質及び安全性を確保するための基本的要件は、平成 12 年 12 月 26 日付け医薬発第 1314 号厚生省医薬安全局長通知別添 2（以下「平成 12 年指針」という。）及び平成 20 年 2 月 8 日付け薬食発第 0208003 号厚生労働省医薬食品局長通知（以下「自己由来細胞・組織加工医薬品等の指針」という。）に定められているところである。本ガイドラインは、細胞・組織加工医薬品等のうち特に重症心不全等の治療を目的として心臓に適用されるもの（細胞シート製品を含む）について、基本的要件に加えて留意すべき要件を示すものである。しかしながら、細胞・組織加工医薬品等の種類や特性は多種多様であり、また本分野における科学的進歩や経験の蓄積は日進月歩であることから、本ガイドラインが必要事項すべてを包含しているとみなすことが必ずしも適切でない場合もある。したがって、個々の細胞・組織加工医薬品等についての試験の実施や評価に際しては、その時点の学問の進歩を反映した合理的根拠に基づき、ケース・バイ・ケースの原則で柔軟に対応することが必要である。

1. 本ガイドラインの対象

本ガイドラインは、重症心不全治療を目的とした細胞・組織加工医薬品等について、品質・有効性・安全性の評価にあたって留意すべき点を示したものである。

2. 用語の定義

本ガイドラインにおける用語の定義は平成 12 年指針及び自己由来細胞・組織加工医薬品等の指針の定義による他、以下のとおりとする。

(1) 心不全：心臓自体の障害により心臓のポンプ機能が低下した結果生じる循環不全であって、組織・臓器が必要とする酸素や血液を十分に供給できなくなった状態をいう。心不全の重症度の評価方法としては NYHA 分類等臨床症状による方法または LVEF 等心機能による方法等が考えられる。重症心不全とは例えば NYHA 分類でⅢ度以上のものをいうが、対象疾患等を勘案し、適切な基準を設定すること。「重症心不全」とは例えば NYHA 分類でⅢ度以上のものや左室駆出率 35%未満など、対象疾患等を勘案し、適切な基準を設定すること。

(2) 細胞シート製品：細胞同士、または細胞と支持体が結合してシート状の形態を呈したものをいう。

(3) 支持体：細胞をシート状に形成するための足場となるものをいい、移植・投与さ

れる細胞シート製品に含有されるか否かを問わない。なお、支持体の原料として生物由来原料が用いられる場合もある。

(4) 特殊な機能を有する培養皿：細胞シート製品を製造するために細胞を培養する機器をいう。温度感受性培養皿のように細胞シートを製造するために細胞との接触面に特殊処理を施している場合もある。

3. 細胞・組織医薬品等の製造工程及び品質管理について

細胞をシート状に形成する場合、次に掲げる事項に関する詳細を示すこと。

細胞シート製品の品質管理上の留意点

① 細胞シート製品の形状評価

必要な面積の基準値、穴・欠損の有無を品質管理項目に設定すること。

例えば血管新生を期待する場合等、有効性・安全性の確保のために必要であれば、細胞シート製品の厚さあるいは層数の基準を設定すること。

② 細胞シート製品の構造的評価

例えば血管網等、細胞シート製品の構造的な要素に関する規定が有効性・安全性の確保に必要な場合は、構成細胞群の population 分布を Flowcytometry 等によって確認することに加え、血管網等が形成されていることを免疫組織化学的検討等の手法により確認し、可能であれば適切な定量的指標の設定を検討すること。

③ 細胞シート製品の力学的特性評価

細胞シート製品に一定の強度が必要な場合には、最低引っ張り応力限界等の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。

④ 温度感受性培養皿を用いた細胞シート製品の輸送

温度感受性培養皿を用いて製造された細胞シート製品は、温度低下により細胞が培養皿から脱着して細胞生存率や細胞機能が低下する可能性があるため、輸送の際は温度管理が特に重要となる。定められた運搬容器及び運搬手順によって、容器内の温度が適切に管理され、製品の品質・有効性・安全性が確保されることを示すこと。

4. 非臨床評価について

動物に細胞・組織加工医薬品等を適用して有効性・安全性を評価する際には、対象疾患を考慮して疾患モデル動物を作成すること。疾患モデル動物作成方法の例として、冠動脈結さつによる心筋梗塞モデル、または overdriving 法による拡張型心筋症モデル等が挙げられる。有効性及び安全性の評価のために、細胞・組織加工医薬品等を適用した

群、対照物質を適用した対照群、さらに必要であれば sham ope 群を用いた比較を実施すること。また、動物への適用・投与方法は、可能な限り臨床でのそれを反映すること。例えば、細胞シート製品については、開胸手術または内視鏡的手術が考えられる。懸濁細胞製品については、開胸手術、内視鏡的手術による心外膜経由でのインジェクション、カテーテルを用いた心内膜経由でのインジェクション（NOGAシステム等）、カテーテル経由での経冠動脈投与、経冠状静脈洞投与等が考えられる。

（１）安全性の評価

① 催不整脈性に関する検討

催不整脈性に関しては、普遍的に受容されたモデル動物は確立されていないため、対象疾患等を考慮して作成した疾患モデル動物を用いる。動物種としては、犬または豚、あるいはこれらに準じた中大動物を用いること。

細胞・組織加工医薬品等を適用前後について、各群における長時間の心電図記録を Holter 心電図等を用いて比較し、不整脈の検出及び重症度の評価を行う。特に、生命に危機を及ぼしうる非持続性心室頻拍、心室性期外収縮の頻度の変化を十分に評価する必要がある。なお、大動物を用いる場合は、細胞・組織加工医薬品等を適用した群で適用前後の心電図記録を比較することも考えられるが、その妥当性は十分に説明する必要がある。

② 塞栓による心筋梗塞発症に関する検討

懸濁細胞の投与により、毛細血管の閉塞による微小梗塞の発症の可能性が考えられることから、心筋逸脱酵素（クレアチンキナーゼ等）の上昇を検討すること。

③ 血清学的評価

腎機能、肝機能の他、急性心筋障害の指標として例えばクレアチンキナーゼ（CK-MB）を、慢性心筋障害の指標として例えば心臓型脂肪酸結合タンパク質（FABP）等を評価すること。

（２）有効性の評価

対象疾患を考慮して、マウスまたはラットのような小動物、ブタまたは犬のような中大動物を用い、適切な評価項目を設定すること。

① 心機能の評価

心全体の機能評価のために、心臓超音波検査、あるいは造影 MRI 等によって収縮能・拡張能を評価する必要がある。その他、例えば、左室内腔短縮率、左室壁運動等の評価を検討すること。必要であれば、目的とする疾患、効能及び効果に応じた評価項目を適切に追加設定すること。

② 血流の評価

例えば FDG-PET による検討あるいは造影剤を用いた心臓超音波検査等により、細胞・

組織加工医薬品等適用後における血流の増加あるいは維持を評価すること。

③ 形態学的評価

適用部位における細胞の生着、細胞・組織加工医薬品等の適用周辺部位の線維変性及び炎症細胞の浸潤の有無、必要に応じて分化の状態を確認すること。細胞シート製品の場合、例えば細胞シート製品縫合部位の組織学的検討、シート内の細胞の肥大化あるいは錯綜配列等の異常の有無の検討も必要となる。可能かつ適切であれば、細胞シート製品に内包される細胞の生存数または残存数、シートの厚み及び形状の変化の検討を行うこと。必要であれば、目的とする疾患、効能及び効果に応じた評価項目を適切に追加設定すること。

④ 血清学的評価

必要かつ適切であれば、例えば脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）等を検討すること。

5. 臨床評価について

臨床データパッケージ及び治験実施計画書は、対象疾患、目的とする効能及び効果、当該治療法に期待される臨床上的位置付け等に応じて、非臨床データ等も踏まえて適切に計画されるべきである。必要に応じて、医薬品医療機器総合機構の対面助言を利用すること。

心筋に細胞・組織加工医薬品等を適用する際には、心筋と適用した細胞の適切な電気的結合の欠如等の原因により、致死的不整脈が誘発される可能性が否定できない。また、用いる細胞によっては腫瘍または石灰化の有無を確認すべき場合もある。そのため、治験を実施する際には、次に掲げる事項に留意する必要がある。

① 不整脈に関する検査の実施

致死性不整脈発生を予測するために細胞・組織加工医薬品等の適用前及び適用後の適切な時期に継続的に以下の検査を行い、必要に応じ抗不整脈薬の投与または植込み型除細動器の挿入を検討すること。検査方法としては、標準 12 誘導心電図、Holter 心電図、加算平均心電図、T wave alternans、電気生理学的検査がある。

② 腫瘍または石灰化の有無の確認

必要に応じて、細胞・組織加工医薬品等の適用後に定期的に CT 検査等を実施することを検討すること。

角膜上皮細胞シート評価指標（案）

はじめに

1. 本ガイドラインの目的
2. 用語の定義
3. 最終製品の品質管理について
4. 効力又は性能を裏付ける試験について
5. 臨床試験について

角膜上皮細胞シート評価指標（案）

はじめに

ヒト由来細胞・組織を加工した医薬品又は医療機器（以下「細胞・組織加工医薬品等」という。）の品質及び安全性を確保するための基本的要件は、平成12年12月26日付け医薬発第1314号厚生省医薬安全局長通知別添2（以下「平成12年指針」という。）及び平成20年2月8日付け薬食発第0208003号厚生労働省医薬食品局長通知（以下「自己由来細胞・組織加工医薬品等の指針」という。）に定められているところである。本ガイドラインは、細胞・組織加工医薬品等のうち特に角膜上皮障害等の治療を目的として適用されるもの（細胞シート製品を含む）について、基本的要件に加えて留意すべき要件を示すものである。しかしながら、細胞・組織加工医薬品等の種類や特性は多種多様であり、また本分野における科学的進歩や経験の蓄積は日進月歩であることから、本ガイドラインが必要事項すべてを包含しているとみなすことが必ずしも適切でない場合もある。したがって、個々の細胞・組織加工医薬品等についての試験の実施や評価に際しては、その時点の学問の進歩を反映した合理的根拠に基づき、ケース・バイ・ケースの原則で柔軟に対応することが必要である。

1. 本ガイドラインの目的

本ガイドラインは、角膜上皮障害等の治療を目的として適用される細胞・組織加工医薬品等（細胞シート製品を含む）について、基本的要件に加えて品質・有効性・安全性の評価にあたって留意すべき要件を示すものである。

2. 用語の定義

本ガイドラインにおける用語の定義は平成12年指針及び自己由来細胞・組織加工医薬品等の指針の定義による他、以下のとおりとする。

(1) 角膜上皮：角膜は表面から、角膜上皮層、角膜実質層、角膜内皮層の3層構造をしている。角膜上皮層は4～5層の角膜上皮細胞から構成されている組織である。

(2) 角膜上皮障害：角膜輪部に存在する角膜上皮幹細胞が、外傷や疾病によって完全に消失したため、角膜表面が混濁した結膜組織に被覆された状態（角膜上皮幹細胞疲弊症）をいう。

(3) 輪部：角膜と結膜の境界部位をいう。輪部の上皮層基部には角膜上皮の幹細胞が存在している。

(4) 細胞シート：細胞同士、または細胞と支持体が結合してシート状の形態を呈したものをいう。

(5) バリア機能：角膜上皮層のような重層化している上皮細胞層では、表層細胞の細

胞間がタイトジャンクションという接着構造で強固に結合して、異物や水などを自由に通さない構造となっている。この機能をバリア機能という。

(6) 細隙灯顕微鏡（スリットランプ）検査：角膜を含めた眼の表面を拡大して観察する眼科臨床検査のひとつをいう。

3. 最終製品の品質管理について

最終製品について、確認試験、効能試験の例として、以下に挙げた試験項目が考えられる。しかしながら、例示した試験項目又はマーカーが必要十分とは限らず、必要かつ適切であれば、別の試験項目又はマーカーを採用又は追加して設定を検討すること。

(1) 確認試験について

- ① 位相差顕微鏡観察等により、上皮細胞特有の細胞形態が培養皿の全面に確認されること。細胞の重層化の程度について適切な基準を設定し、基準に適合することを確認すること。
- ② 組織切片の作製等により、細胞がシートを形成していることを確認すること。
- ③ 角膜上皮特異的マーカー（例えば K3、K12 等）に対する抗体等を用いてシートを構成している細胞が正常に分化していることを確認すること。
- ④ 細胞の分化状態及び増殖性との相関が報告されている指標（p63 の発現など）を用いた試験を検討すること。

(2) 純度試験について

例えば上皮系細胞マーカーである pancyokeratin 等を用いた細胞シート内の細胞均一性の解析などが考えられる。

(3) 効能試験について

例えば、バリア機能との相関が報告されている適切なマーカー（ZO-1 等）の発現解析、細胞重層化の定量、経上皮電気抵抗値（TEER、Transepithelial Electrical Resistance）等により、細胞シートに要求される機能の評価法について検討する事が考えられる。ただし、使用するマーカーの妥当性については十分に合理的な説明が必要である。

4. 効力又は性能を裏付ける試験について

疾患モデル動物としては、例えば、ウサギ、イヌ、ブタ、サル等の中大型動物を用いた角膜上皮幹細胞疲弊症モデル等が考えられる。用いた動物モデルの作製方法を示した上でその妥当性を説明する必要がある。また、モデル動物の寿命を考慮しつつ、必用な評価期間を設定し、その妥当性について説明する必要がある。有効性の検討には、適切な対照群を設定し、統計学的手法を用いて評価することが望ましい。

検査項目としては、例えば以下を検討することが考えられるが、必要かつ適切であれば試験項目の追加を検討すること。なお、有効性に加え安全性の評価を実施する場合に

は、有害事象（眼感染症等）の発生等の適切な項目を設定すること。

(1) 細隙灯顕微鏡（スリットランプ）検査による角膜の評価

細隙灯顕微鏡検査により、角膜の透明性を Grade 分けし、スコア化して評価を行うことが考えられる。この場合、スコア化の妥当性について十分に合理的な説明が必要である。

また、結膜組織及び血管の侵入の程度、バリア機能の維持、角膜表面が目的とする細胞・組織により被覆されていること等について確認する必要がある。

角膜の透明性に関する Grade の例：

Grade 0; 角膜が透明もしくは、角膜に微細な混濁（ヘイズ）がある。Grade 1; 角膜に軽度の混濁が認められる。Grade 2; 角膜に中程度の混濁が認められ、部分的に虹彩の詳細をはっきり観察できない。Grade 3; 角膜に重度の混濁が認められ、眼内組織をはっきり観察できない。

(2) 形態学的評価

移植後の角膜組織を採取し、HE 染色、免疫染色法などにより角膜上皮の状態を評価する。HE 染色により、血管侵入の有無、角膜上皮の重層化の程度、結膜上皮で見られる杯細胞の有無を確認する。角膜に由来する細胞を原材料として用いた場合は、角膜上皮特異的マーカーのK3、K12等の免疫染色により、角膜表面が角膜上皮型細胞に被覆されていることを確認する。

5. 臨床試験について

臨床データパッケージ及び治験実施計画書は、対象疾患、目的とする効能及び効果、当該治療法に期待される臨床上の位置付け等に応じて、非臨床データ等も踏まえて適切に計画されるべきである。必要に応じて、医薬品医療機器総合機構の対面助言を利用すること。

培養上皮細胞シート作製のための温度応答性培養皿について

1. 原材料・規格
2. 温度応答性高分子による培養皿表面の修飾
3. 培養皿（多孔性膜）表面への温度応答性高分子の固定とその確認
4. 未反応の遊離モノマー、非固定高分子の洗浄と汚染物等の有無の確認
5. 滅菌バリデーション、材料調製の再現性

培養上皮細胞シート作製のための温度応答性培養皿について

1. 原材料・規格

1-1. 原材料

原材料あるいは N-イソプロピルアクリルアミド (NIPAAm)、および電子線重合時に NIPAAm を溶解する溶媒 (2-プロパノール等) については、購入品の、①メーカー名、②メーカー規格、③受け入れ規格 (試験方法)、④保管条件、⑤使用期限 (未開封、開封後) について定めておく。納品後に精製を行う場合は、その精製方法、検査方法、及び、精製後の保存方法と使用期限についても明示しておく必要がある。

1-2. 基材

温度応答性高分子が固定される基材には、市販の培養皿の使用、あるいは、独自に作製された射出成型品の培養皿、膜等のプラスチック基材等の使用が考えられる。同様に、市販の多孔成膜を持つ培養基材、あるいは独自に作成された射出成型品、平幕、多孔性膜などのプラスチック基材の使用が考えられる。いずれにおいても、①形状、②原材料 (組成等)、③メーカー規格、④受け入れ規格 (試験方法)、⑤使用期限を定めておく。

2. 温度応答性高分子による培養皿表面の修飾

2-1. 重合の反応機構

基材表面への温度応答性高分子の固定には、電子線重合法を用いていることが多い¹⁻⁴⁾。基本的には、ラジカル重合反応に基づいて温度応答性高分子が基材表面に固定される。

電子線照射により、プラスチック基材表面にラジカル (遊離基) が発生し、これが表面に塗布した溶液中のモノマーの重合を開始し、表面に温度応答性高分子が固定される。同時に、表面に固定された高分子間で、電子線照射に伴うラジカルが発生するために、このラジカル同士の結合によって架橋反応が起こると考えられる。電子線重合反応の過程では、熱可塑性ポリマーからなる基材には変形など起こらずに表面改質だけが達成される。

2-2. 温度応答性高分子の培養皿表面への導入法

製造においては、製品標準書に定められた規格の製品が製造できるように、使用する機器 (電子線照射装置) に求められる性能や、製品の製造条件について規定し、

予め定められた標準作業手順（SOP）に従って作業を行う必要がある。

温度応答性培養皿（多孔性膜）は、電子線重合によりたとえば以下のように製造される。

- i) 所定濃度の NIPAAm モノマーの溶液を調製する。
- ii) 電子線照射直前に加工前培養皿上に所定量のモノマー溶液を滴下し、モノマー溶液を培養皿、または多孔性膜の細胞接着面全面に展開する。
- iii) エリアビーム型電子線照射装置にて電子線を照射し、モノマーの重合と基材表面へのポリマーの固定を行う。
- iv) 残存の可能性のある非固定ポリマー、並びに未反応モノマーは、冷水にて洗浄・除去し、乾燥する。

3. 培養皿（多孔性膜）表面への温度応答性高分子の固定とその確認

電子線重合後の温度応答性高分子修飾培養皿または多孔性膜は、無色透明な材料であり、外観は無処理のポリスチレン製細胞培養皿または無処理の多孔性膜と同じであり、見た目だけで温度応答性高分子層が表面に修飾されていることが確認できない。培養皿または多孔性膜へのポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）（PNIPAAm）の固定の確認は、一般的な高分子修飾表面の物性解析法を適用することで可能である。具体的な方法を以下に示すが、製品においては製品標準書に定められた規格が満足されるように、確認方法（検査方法）に最適化する必要がある。

3-1. 全反射赤外分光分析（ATR/FT-IR）

たとえば、基材がポリスチレンである場合は以下のような解析を行う。

温度応答性高分子を修飾したポリスチレン培養皿表面を板状に切り出し、試料とする。赤外分光光度計の ATR ユニット上、Ge プリズムを用い、この表面に試料を密着させて赤外分光分析を行う。温度応答性高分子を修飾したポリスチレンでは基材のポリスチレンには存在しないアミド結合に由来するカルボニル（C=O）の吸収が 1650cm^{-1} に確認される。同時に、 1600cm^{-1} に基材のポリスチレン由来の芳香環に由来する吸収が観察される。PNIPAAm アミド結合と基材の一置換芳香環の吸収強度比（ I_{1650}/I_{1600} ）が、表面固定した高分子量に関連することから、任意の温度応答性培養皿表面上に修飾した温度応答性高分子の固定量が算出できる。すなわち、既知量のポリマーをポリスチレン基材表面にキャストし、この表面上で I_{1650}/I_{1600} を測定する。これにより検量線を作製し、電子線重合によって調製した温度応答性高分子修飾培養皿上の PNIPAAm 量を規定できる。

多孔性膜基材がポリエチレンテレフタレート（PET）である場合は、ポリエチレ

ンテフタレート主鎖に存在するエステルカルボニル由来の吸収が 1750cm^{-1} 付近に観測されるので、 I_{1650}/I_{1750} を用いて多孔性膜上の PNIPAAm 量を規定できる。

3-2. 静的接触角測定

温度応答性高分子修飾培養皿（または多孔性膜）表面の、所定温度における水との接触角を液滴法により測定し、基材では認められない接触角の温度依存性を示すことを確認する。つまり、高温側で接触角が大きな値を示しより疎水的な表面物質を、また低温側で水の接触角が小さくより親水的な表面物質を示すかどうか、を確認する。

表面の水に対する接触角の変化は、表面固定高分子鎖の温度変化に伴う水和/脱水和変化に基づく。すなわち、PNIPAAm の転移温度である 32°C を境に低温側で高分子鎖が水和、伸長し、水に対する接触角が小さくなる一方、 32°C より高温側で、高分子鎖が脱水和・凝集して水に対する接触角が比較的大きくなる。

3-3. X線光電子分光分析(XPS)

XPS による表面元素分析を通じ、ごく界面近傍の元素組成（たとえば C、N、O）が解析できると同時に、各元素のシグナル強度比から表面固定された高分子の元素組成が類推できる。たとえば PNIPAAm の N/C 比と観測された元素組成から求めた N/C 比の比較から高分子の固定が類推できる。さらに、C1s シグナルの波形解析から NIPAAm 由来のモノマー単位の構造に由来する信号（主鎖、アミドカルボニルなど）を確認し、温度応答性高分子の修飾が確認できる。

3-4. 二次イオン質量分析(SIMS)（依頼測定：オプション）

温度応答性高分子修飾表面の二次イオン質量分析を行い、NIPAAm モノマーの分子構造に由来する二次イオンに基づくシグナルが観測できるかを確認する。

4. 未反応の遊離モノマー、非固定高分子の洗浄と汚染物等の有無の確認

4-1. 未反応物の洗浄操作

1-2-2. iv) 項に示したとおり、電子線重合後に残存する未反応の遊離モノマーや非固定高分子は冷水に可溶であり、冷水に浸漬するとともに、水流下で洗浄・除去できる。溶出試験等による評価は、製品標準書において予め設定した安全性が担保できる測定方法を選択し、試験を行う必要がある。

4-2. 温度応答性培養皿の安全性評価^①

製造された培養皿にさらに汚染物等が残留していないことの確認を行う必要がある。具体的には、灰化試験による蒸発残分評価や、溶出物試験による泡立ち（消失時間）、pH（ブランク差）、 KMnO_4 消費量、UV スペクトル、蒸発残留物、重金属、

及びエンドトキシン量の評価が挙げられる。それぞれについて、培養皿にて最適な検出能力を有する測定方法を選択し、製品標準書において予め設定した安全性が担保できる試験を行う必要がある。

5. 滅菌バリデーション、材料調製の再現性

滅菌方法には、エチレンオキシドガス（EOG）滅菌、あるいはガンマ線滅菌、電子線滅菌などの放射線滅菌が考えられ、医療機器一般では、作業者の安全性の観点より EOG 滅菌を避け、放射線滅菌を行うことが推奨されているが、特殊な材料を用いた医療機器については、放射線滅菌は不適であるため、EOG 滅菌を用いることがある。温度応答性培養皿も同様の理由により EOG 滅菌を選択することが考えられるが、その場合、細胞に対する障害生についても考慮を行い、エチレンオキシド残留濃度を決定する必要がある。

また、同一ロット内、ロット間においてランダムに取り出した試料（培養皿、または多孔性膜）上に修飾されたポリマー固定量がほぼ一定であるかどうかについては、適当な評価方法を選択し、実行する必要がある。

参考文献

- 1) H. Sakai, Y. Doi, T. Okano, N. Yamada, Y. Sakurai, in *Advanced Biomaterials in Biomedical Engineering and Drug Delivery System*, Eds. By N. Ogata, et al., Springer, Tokyo, 1996. pp. 229-230.
- 2) N. Yamada, T. Okano, H. Sakai, F. Karikusa, Y. Sawasaki, Y. Sakurai, *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, **11**, 571 (1990).
- 3) T. Okano, N. Yamada, H. Sakai, Y. Sakurai, *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 1243 (1993).
- 4) T. Okano, N. Yamada, M. Okuhara, H. Sakai, Y. Sakurai, *Biomaterials*, **16**, 297 (1995).
- 5) 参考基準
 - 滅菌済の輸血セット基準等について（医薬発第 1079 号）
 - 人工肺および人工心肺用血液回路基準等について（医薬発第 1439 号）
 - 点眼剤用プラスチック容器の規格及び試験法について（薬発第 336 号）
 - エチレンオキシドガス滅菌における残留ガス濃度の限度値の取り扱いに関して（医薬審第 353 号）