

平成 21 年度

次世代医療機器評価指標作成事業

再生医療審査 WG 報告書

再生医療審査 WG 座長

大阪保健医療大学

中村 憲正

目 次

I. 次世代医療機器評価指標作成事業再生医療審査 WG 委員名簿

II. 平成 21 年度 WG 会議議事概要

III. 関節軟骨再生評価指標（案）

IV. 調査事項

1. 関節軟骨再生評価指標調査報告

佐藤 陽治

2. 関節軟骨再生製品についての生体適合性を含めた生物学的安全性評価の考え方

松岡 厚子

3. Mechanical testing（侵襲的方法も含む評価法全般）について

牛田 多加志

4. 実験動物・疾患モデルの選択について

佐藤 正人

5. 臨床研究に関する報告

星 和人、中村 憲正、勝呂 徹

V. 参考資料

1. ヒト（自己・同種）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

1-1. 平成 20 年 9 月 12 日付「平成 20 年 2 月 8 日付 ヒト（自己）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保についての修正後の通知」

1-2. 平成 20 年 9 月 12 日付「ヒト（同種）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について」

2 . Guidance for Industry Preparation of IDEs and INDs for Products Intended to Repair or Replace Knee Cartilage (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research Center for Devices and Radiological Health, 2007)

3 . Draft Reflection Paper on In-Vitro Cultured Chondrocyte Containing Products for Cartilage Repair of the Knee (European Medicines Agency, EMEA/CAT/CPWP/288934/2009)

4 . Assessment Report for ChondroCelect and Annex I (European Medicines Agency, EMEA/724428/2009)

I. 次世代医療機器評価指標作成事業
再生医療審査 WG 平成 21 年度委員名簿

**次世代医療機器評価指標作成事業
再生医療審査 WG 平成 21 年度委員名簿（敬称略）**

座長

中村憲正 大阪保健医療大学 保健医療学部 教授

委員（五十音順）

牛田多加志 東京大学 医学部・大学院医学系研究科
附属疾患生命工学センター再生医療工学部門 教授

佐藤正人 東海大学 医学部 外科学系整形外科 准教授

佐藤陽治 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部第二室 室長

勝呂 徹 東邦大学 医学部 整形外科教室 教授

堤 定美 日本大学 歯学部 特任教授

星 和人 東京大学大学院医学系研究科
軟骨・骨再生医療寄附講座（富士ソフト） 特任准教授

松山晃文 先端医療振興財団先端医療センター研究所
髒臓再生研究グループ グループリーダー

厚生労働省

関野秀人 厚生労働省 医療機器審査管理室 室長

東健太郎 厚生労働省 医療機器審査管理室 新医療材料専門官

秋元朝行 厚生労働省 医療機器審査管理室 先進医療機器審査調整官

牧村知美 厚生労働省 医療機器審査管理室 認証係長

加藤革己 厚生労働省 医療機器審査管理室

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

小林陽子 医薬品医療機器総合機構 生物系審査第二部 審査専門員

嶽北和宏 医薬品医療機器総合機構 生物系審査第二部 審査専門員

末岡明伯 医薬品医療機器総合機構 品質管理部 基準課

オブザーバー

本間一弘 産業技術総合研究所 人間福祉医工学部門 副部門長

田口隆久 産業技術総合研究所 研究コーディネータ

国立医薬品食品衛生研究所（事務局）

松岡厚子 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 療品部第四室 室長

加藤玲子 国立医薬品食品衛生研究所 療品部 主任研究官

II. 平成 21 年度 WG 会議議事概要

次世代医療機器評価指標作成事業再生医療審査 WG
平成 21 年度第一回会議議事録(概要)

1. 開催日時: 2009 年 10 月 5 日 (月) 15 時~17 時
2. 開催場所: オフィス東京 C5 会議室
3. 出席者(敬称略)
委員: 中村憲正(大阪保健医療大学)、牛田多加志(東京大学)、佐藤正人(東海大学)、
佐藤陽治(国立医薬品食品衛生研究所)、勝呂徹(東邦大学)、堤定美(日本大学)、
松山晃文(先端医療センター研究所)
厚生労働省: 関野秀人、東健太郎、秋元朝行
医薬品医療機器総合機構: 小林陽子 嶽北和宏 (鹿野真弓代理)、末岡明伯
オブザーバー: 本間一弘(産業技術総合研究所)
事務局(国立医薬品食品衛生研究所): 松岡厚子、澤田留美、加藤玲子
4. 配布資料
 1. 平成 21 年度第一回委員会議事次第
 2. 平成 21 年度委員名簿
 3. 再生医療(細胞シート)審査 WG 平成 20 年度報告
 4. 角膜内皮細胞シート評価指標(案)
 - 5-1. 薬食発第 0208003 号「ヒト(自己)由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について」
 - 5-2. 薬食発第 0912007 号「ヒト(同種)由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について」
 - 6-1. Guidance for Industry Preparation of IDEs and INDs for Products Intended to Repair or Replace Knee Cartilage
 - 6-2. 資料 6-1.の翻訳文
 - 7-1. Commentary on FDA Draft Guidance for Industry entitled “Preparation of IDEs and INDs for Products Intended to Repair or Replace Knee Cartilage” (委員のみ配布)
 - 7-2. 資料 7-1.の翻訳文 (委員のみ配布)
5. 議事内容
 - ①平成 17~20 年度における WG 活動内容についての説明が事務局より報告された。
 - ②平成 21 年度の座長及び委員による自己紹介が行われた。委員は下記の通り。(敬称略)
座長: 中村憲正 大阪保健医療大学 教授

委員(五十音順):

牛田多加志 東京大学 医学部・大学院医学系研究科

附属疾患生命工学センター再生医療工学部門 教授

佐藤正人 東海大学 医学部 外科学系整形外科 准教授

佐藤陽治 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部第二室 室長

勝呂 徹 東邦大学 医学部 整形外科教室 教授

堤 定美 日本大学 歯学部 特任教授

星 和人 東京大学大学院 医学系研究科

軟骨・骨再生医療寄附講座(富士ソフト) 特任准教授

松山晃文 先端医療センター研究所 膵臓肝臓再生研究グループ グループリーダー

③「軟骨再生に関する現在の世界の動向について」中村座長による講演がなされた。

④平成21年度の活動方針について

- ・今年度は、「軟骨再生」についての評価指標素案作成を行う予定。
- ・FDA の文書「Guidance for Industry Preparation of IDEs and INDs for Products Intended to Repair or Replace Knee Cartilage」に挙げられているそれぞれの項目について、日本における評価指標を作成するにあたり、利用できる点や訂正すべき点など、Commentary on FDA Draft Guidance の内容も加味しつつ検討していく。
各項目についての作業分担は下記の通り。
 - Mechanical testing (非侵襲的評価法)について 堤委員
 - Mechanical testing (侵襲的方法も含む評価法全般)について 牛田委員
 - Clinical Study について 中村座長、勝呂委員
 - 動物実験について 佐藤(正)委員
 - 細胞ソースについて (MSC vs Chondrocytes 有用性と限界) 星委員
 - 培養細胞の安全性について 松山委員、佐藤(陽)委員、星委員
 - 生体適合性について 松岡事務局長
- ・第二回会議では、3名(間葉系間細胞の安全性について2名、開発企業の立場から1名)お招きし、講演をしていただく予定。

⑤今後の会議日程

第二回会議 : 平成21年11月9日(月) 15時~17時 オフィス東京にて

第三回会議 : 平成21年12月18日(金) 14時~16時 オフィス東京にて

第四回会議 : 平成22年2月19日(金) 14時~16時 オフィス東京にて

次世代医療機器評価指標作成事業再生医療審査 WG
平成 21 年度第二回会議議事録(概要)

1. 開催日時： 2009 年 11 月 9 日（月） 15 時～17 時
2. 開催場所： オフィス東京 S 会議室
3. 出席者(敬称略)
委員： 中村憲正(大阪保健医療大学)、牛田多加志(東京大学)、佐藤正人(東海大学)、
佐藤陽治(国立医薬品食品衛生研究所)、勝呂徹(東邦大学)、堤定美(日本大学)、
星和人(東京大学)、松山晃文(先端医療センター研究所)
厚生労働省： 関野秀人、牧村知美、秋元朝行、加藤革己
医薬品医療機器総合機構： 末岡明伯、小林陽子 嶽北和宏（鹿野真弓代理）
オブザーバー： 本間一弘(産業技術総合研究所)
招待講演者： 安達伸生(広島大学)、梅澤明弘(国立成育医療センター研究所)、
加藤幸夫(広島大学)
事務局(国立医薬品食品衛生研究所)： 澤田留美、加藤玲子、石川格

4. 配布資料

1. 平成 21 年度第二回委員会議事次第
2. 平成 21 年度第一回委員会議事録(概要)

5. 議事内容

- ①平成 21 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。
- ②本 WG にて今年度「軟骨再生」についての評価指標素案作成を行うにあたり、3 名の専門家の先生をお招きし、ご講演頂いた。

まずは、培養軟骨の開発者の立場から広島大学大学院医歯薬学総合研究科整形外科学准教授の安達伸生先生より「自家培養軟骨細胞移植術－臨床応用への道のり－」についてご講演頂いた。引き続き、MSC の臨床応用への可能性やその安全性の担保といった観点から国立成育医療センター研究所生殖医療研究部部長の梅澤明弘先生より「間葉系幹細胞研究と再生医療への臨床応用」について、さらに広島大学大学院医歯薬学総合研究科教授の加藤幸夫先生より「無血清培地による MSC の増幅と安全性の検討」についてご講演頂いた。

講演終了後にそれぞれ質疑応答を行い、講演内容を踏まえ今年度の軟骨再生に関する評価指標作成に関して討議した。

③第三回(次回)委員会では、下記の先生方の作業分担内容についての報告を行って頂き、内容について討議する予定。

- 動物実験について 佐藤(正)委員
- 培養細胞の安全性について 松山委員、佐藤(陽)委員
- 生体適合性について 松岡事務局長

⑤今後の会議日程

第三回会議 : 平成21年12月18日(金) 14時~16時 オフィス東京にて
第四回会議 : 平成22年2月19日(金) 14時~16時 オフィス東京にて

次世代医療機器評価指標作成事業再生医療審査 WG
平成 21 年度第三回会議議事録(概要)

1. 開催日時： 2009 年 12 月 18 日（金） 14 時～17 時
2. 開催場所： オフィス東京 C5 会議室
3. 出席者(敬称略)
委員： 中村憲正(大阪保健医療大学)、堤定美(日本大学)、牛田多加志(東京大学)、松山晃文(先端医療センター研究所)、佐藤正人(東海大学)、佐藤陽治(国立医薬品食品衛生研究所)、星和人(東京大学)、藤原夕子(星委員途中退席につき代理)
厚生労働省： 関野秀人、東健太郎、秋元朝行、加藤革己
医薬品医療機器総合機構： 小林陽子 嶽北和宏（鹿野真弓代理）
オブザーバー： 本間一弘(産業技術総合研究所)
招待講演者： Seok-Jung Kim 先生
(Uijungbu St Mary's Hospital, The Catholic University, Korea)
事務局(国立医薬品食品衛生研究所)： 松岡厚子、澤田留美、加藤玲子
4. 配布資料
 1. 平成 21 年度第三回委員会議事次第
 2. 平成 21 年度第二回委員会議事録(概要)
 3. 当日配布資料
EMEAの書類三通
1: H-878-ChondroCelect 評価報告書
2: H-878-附属書I
3: 省察書—膝軟骨修復用製剤を含有するインビトロ培養軟骨細胞について
5. 議事内容
 - ①平成 21 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韓国を含め世界の(特に欧州 EMEA)細胞治療の産業化(規制)について造詣の深い Seok-Jung Kim 先生をお招きし、韓国の細胞治療の産業化の現状についてご講演頂いた。講演終了後に質疑応答を行い、他国での状況をご教授いただいた。
 - ③本 WG にて今年度「軟骨再生」についての評価指標素案作成を行うにあたり、下記の先生方の作業分担内容についての報告を行って頂いた。
- 培養細胞の安全性について 松山委員、佐藤(陽)委員

- 動物実験について 佐藤(正)委員
- 生体適合性について 松岡事務局長

講演終了後にそれぞれ質疑応答を行い、講演内容を踏まえ今年度の軟骨再生に関する評価指標作成に関して討議した。

④第四回(次回)委員会では、下記の先生方の作業分担内容についての報告を行って頂き、内容について討議する予定。

- 効力・性能評価について 堤委員、牛田委員
- 臨床試験について 中村委員、星委員

⑤EMEA の文書の和訳を外部委託し、後日委員に配布することになった。

今後の会議日程

第四回会議 : 平成 22 年 2 月 19 日(金) 14 時~17 時 オフィス東京にて

次世代医療機器評価指標作成事業再生医療審査 WG
平成 21 年度第四回会議議事録(概要)

1. 開催日時： 2010 年 2 月 19 日（金） 14 時～17 時 20 分
2. 開催場所： オフィス東京 S 会議室
3. 出席者(敬称略)
委員： 中村憲正(大阪保健医療大学)、堤定美(日本大学)、牛田多加志(東京大学)、佐藤正人(東海大学)、佐藤陽治(国立医薬品食品衛生研究所)、星和人(東京大学)
厚生労働省： 牧村知美
医薬品医療機器総合機構： 小林陽子 嶽北和宏（鹿野真弓代理）
オブザーバー： 本間一弘(産業技術総合研究所)
事務局(国立医薬品食品衛生研究所)： 松岡厚子、澤田留美、加藤玲子
4. 配布資料
 1. 平成 21 年度第四回委員会議事次第
 2. 平成 21 年度第三回委員会議事録(概要)
 3. 軟骨再生評価指標(案)たたき台
 4. EMEA の書類三通: 和訳
 - 4-1: H-878-ChondroCelect 評価報告書
 - 4-2: H-878-附属書 I
 - 4-3: 省察書—膝軟骨修復用製剤を含有するインビトロ培養軟骨細胞について
 5. FDA の書類: 和訳
 - 5-1: FDA の産業向けガイダンス草案、「膝関節軟骨修復・置換用製品に関する IDE 及び IND の作成」
 - 5-2: FDA の産業向けガイダンス草案、「膝関節軟骨修復・置換用製品に関する IDE 及び IND の作成」に関する意見書(委員のみ)
 6. 次世代医療機器評価指標
 - (別添3)重症心不全細胞治療用細胞シートに関する評価指標
 - (別添4)角膜上皮細胞シートに関する評価指標

5. 議事内容

- ①平成 21 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「対象疾患」の確認がおこなわれ「損傷関節軟骨」にすると委員間の合意が得られた。
- ③それにともない今年度の評価指標素案のタイトルを「軟骨再生」から「関節軟骨再生」に変更することになった。
- ④関節軟骨再生評価指標(案)のたたき台を用いて、各項目ごとに出席した全委員で内容を精査し、修正・補足事項を列挙した。
- ⑤作業分担内容について、下記の分担委員より報告があった。
 - 効力・性能評価について 牛田委員、堤委員
 - 臨床試験について 星委員それぞれの作業分担内容について各担当委員より平成 21 年度報告書への掲載をおこなうことを確認した。

今後の予定

今回の会議内容を踏まえて、評価指標(案)についてメールにて委員間で議論し、最終案を作成する。

III. 関節軟骨再生評価指標(案)

1. はじめに
2. 本評価指標の対象
3. 本評価指標の位置づけ
4. 用語の定義
5. 評価にあたって留意すべき事項
6. 効力または性能を裏付ける試験について
7. 体内動態について
8. 臨床試験（治験）
9. 参考文献

関節軟骨再生に関する評価指標（案）

1. はじめに

関節軟骨は荷重衝撃の緩衝、関節滑動性の獲得に重要な役割を担っているが、血行に乏しく難治性の組織である。一旦損傷すると十分に修復されることは無く、損傷部の放置は軟骨下骨病変を合併し二次性の関節症変化へと進展することも多い。全世界で変形性関節症の潜在患者数は数千万人とも推定され、本症による中高年者の日常生活動作（ADL）低下の問題は大きな社会問題となりつつある。従って有効な軟骨の治療法の開発は急務である。近年、軟骨組織を対象として再生医療的手法（軟骨細胞や軟骨細胞への分化能を有する間葉系幹細胞移植）を用いた新規治療法が研究されている。しかし、わが国においてこれらの革新的な医療機器の開発研究は盛んに行われているが、臨床応用への展開は諸外国に比べて遅れていると言える。その理由として次世代医療機器の臨床応用にあたり、明確なる評価指標がないことが一因と考えられる。このような状況を踏まえ、関節軟骨再生について科学的根拠を基盤にした品質、有効性及び安全性の評価を適性かつ迅速に進めるために本評価指標を作成した。

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な技術要件は、平成20年2月8日付薬食発第0208003号厚生労働省医薬食品局長通知（以下「ヒト(自己)由来細胞・組織加工医薬品等の指針」という。）及び平成20年9月12日付薬食発第0912006号厚生労働省医薬食品局長通知（以下「ヒト(同種)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。本評価指標は、ヒト由来細胞・組織加工医薬品等のうち特に損傷関節軟骨等の治療を目的として軟骨に適用される、ヒト軟骨細胞加工医薬品等又はヒト間葉系幹細胞加工医薬品等について、上述の基本的な技術要件に加えて留意すべき事項を示すものである。

2. 本評価指標の対象

本評価指標は、損傷関節軟骨等の治療を目的として適用されるヒト軟骨細胞加工医薬品等又はヒト間葉系幹細胞加工医薬品等について、基本的な技術要件に加えて品質、有効性及び安全性の評価にあたって留意すべき事項を示したものである。現時点ではヒト ES 細胞、iPS 細胞等の多能性幹細胞由来の製品および異種細胞・組織由来の製品は本評価指標の対象とはしない。

なお、開発する製品が医療機器に該当するか判断し難い場合は、必要に応じ、厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室に相談すること。

3. 本評価指標の位置づけ

細胞・組織加工医薬品等の種類や特性、臨床上の適用法は多種多様であり、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、本評価指標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。従って、本評価指標は申請内容に関して拘束力を有するものではなく、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・ケースで柔軟に対応することが必要である。なお、本評価指標の他、「ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の指針」、「ヒト（同種）由来細胞・組織加工医薬品等の指針」及び国内外のその他の関連ガイドラインを参考にすることも考慮すべきである。

4. 用語の定義

本評価指標における用語の定義は、ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の指針及びヒト（同種）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) 軟骨細胞：軟骨の細胞外基質中に存在し、主にコラーゲン(II, IX, XI 型等)とプロテオグリカン（アグリカンを主とする）を分泌し軟骨基質を形成することを特徴とする細胞を一般的には指すが、本評価指標で原材料とする細胞はその前駆細胞（軟骨芽細胞）、軟骨細胞ないし軟骨芽細胞を豊富に含む細胞集団及び体外でこれらの細胞を培養して得られた細胞を含む。
- (2) 間葉系幹細胞：間葉系組織中に存在し、多分化能を有しかつ自己複製能力を維持しているもの又はそれに類することが推定されるもの、及びこれを豊富に含む細胞集団をいうが、本評価指標では骨髄間質細胞も含む。また、体外でこれらの細胞を培養して得られた細胞を含む。
- (3) 粘弾性：粘性と弾性とを併せ持つ性質。軟骨組織の力学的特性において重要なファクターである。特に粘性は、歩行や運動といった時間的に変化する荷重に対して関節軟骨が応答する際に、重要な働きをする。

5. 評価にあたって留意すべき事項

損傷関節軟骨等の治療を目的とした細胞・組織加工医薬品等には、原材料と適用との関係性から、1) 原材料として採取されるドナーの細胞・組織が患者の適用部位の細胞・組織と同様の基本機能をもつ場合（相同使用 Homologous Use）と、2) そうでない場合（非相同使用 Non-homologous Use）とに分けられる。本評価指標においては昨今の国内外の研究開発状況を鑑み、前者の場合には主にヒト軟骨細胞加工医薬品等、後者の場合には主に軟骨以外の組織に由来するヒト間葉系幹細胞を原材料とする細胞・組織加工医薬品等を対象とする。両者の安全性・有効性上の大きな差異とし

ては、前者の場合には適用部位における細胞組織の既知の生理学的機能からその有効性の機序を理解することが比較的容易と想定される可能性が高いのに対し、後者の場合には移植段階で軟骨細胞様の表現型を呈さない、及び有効性を裏付ける機序が複数である可能性やそれらの確認が困難である可能性が高い。従って、間葉系幹細胞加工医薬品等と軟骨細胞の相同使用による軟骨細胞加工製品とでは、有効性の評価、その機序の理解、及び製品中の細胞の適用部位における機能に基づくリスクの評価に関し、留意点が異なる可能性があることに注意が必要である。

製品評価について、以下に挙げた試験項目が考えられる。しかしながら、製品によっては例示した試験項目又はマーカーが必要十分とは限らず、また逆に不必要な場合もある。さらに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し、使用する妥当性を説明すること。

(1) 細胞数および生存率

出発原料となる軟骨細胞又は間葉系幹細胞は採取組織に由来する量的な制約がある。軟骨細胞は体外培養すると脱分化する傾向を持ち、また間葉系幹細胞も体外培養によりその表現型を変化させる傾向を持つ。いずれの体細胞種も、ドナーの年齢または長期の培養等の条件により増殖速度が低下する場合もあるため、体外での増殖にも限度があり、最終製品に使用可能な細胞数は、出発原料として得られた細胞の数に応じて量的な制約を持つ。従って、意図する治療部位のサイズに見合った量の最終製品を製造するために十分な量の細胞を確保するためには、原材料又は中間製品中に存在する細胞の数及び生存率について判定基準を設定しておく必要がある。また、最終製品における細胞の生存率についても基準を設定すること。

(2) 確認試験

目的とする体内での有効性（軟骨形成能、軟骨機能など）を達成し、かつ安全性上の問題（意図しない分化、過形成、異常増殖など）を可能な限り回避するとともに、一定の品質及び安定性を保持するために必要な、最終製品中の細胞の重要細胞特性指標を定め、これらを用いて最終製品中の細胞が目的の細胞であることを確認すること。組織工学的手法により製造された製品については、マトリックス中、スキャフォールド上などに播種されて製造された最終製品の細胞の生存率・密度・形態学的特徴などを確認すること。なお、最終製品の規格を最も良く実現するために必要な、原材料及び中間製品の重要細胞特性指標を設定することも必要である。量的制約や複雑な品質特性のために最終製品において細胞の特性を必要十分に評価できない場合には、中間製品（または原材料）で評価することが選択肢となる場合もある。ただし、そのためには中間製品（または原材料）の特性が最終製品の品質に関する適正な道標となるという合理性を示すことが必要である。

(3) 細胞の純度試験

細胞の純度は品質管理における重要な要素であり、工程評価を通じて規格を設定すべきものである。原材料、中間製品、最終製品の各段階における目的細胞については、確認試験で定めた重要細胞特性指標に基づいて定義すること。混入細胞（例えば骨芽細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞、その他の採取時に混入する可能性のある細胞）、又は原材料・製造工程における幹細胞の意図しない分化により生じた体細胞（様）細胞、未分化細胞又は脱分化細胞、異常増殖細胞、形質転換細胞といった目的細胞以外の細胞の検出並びにその安全性を確認する試験方法及び判断基準を設定すること。

(4) 細胞の培養期間の妥当性

培養期間の妥当性及び細胞の安定性を評価するために、予定の培養期間を超えて培養した細胞において脱分化ないし多分化能の減弱、もしくは増殖速度の異常変動などの目的外の変化がないことを適切な細胞指標を用いて示すこと。適用後に体内での増殖および分化等を期待する場合には、設定された基準による継代数又は分裂回数で期待された機能を発揮することを明らかにすること。

(5) 非細胞材料および最終製品の生体適合性

製品に関係する非細胞材料については、細胞とともに最終製品の一部を構成するもの（マトリックス、医療材料、スキャフォールド、支持膜、ファイバー、ビーズ等）だけでなく、製造工程中で細胞と接触するものおよび適用時に使用されるもの（局所封入用の膜、フィブリン糊等）に関しても、材料自体の品質・安全性に関する知見について明らかにするとともに、生体適合性等、患者及び製品中の細胞との相互作用に関する知見について明らかにすること。また、最終製品総体についても患者の細胞組織、特に適用部位周辺組織との相互作用について評価すること。また、最終製品の一部を構成する非細胞材料の、製造工程中（培地中）及び体内での分解特性、体内での再吸収特性、分解物の安全性に関して適切な情報を提供すること。特に、生体吸収生材料を用いる場合には、分解生成物に関して必要な試験を実施すること。非細胞材料の生体適合性については、ISO10993-1、JIS T 0993-1 又は ASTM F 748-04 等を参考にすること。

(6) 力学的適合試験

最終製品の段階で軟骨組織と類似した力学特性を持つなど、最終製品の態様によっては最終製品自体に耐荷重性、摺動特性、粘弾性等における適合性が要求される。これらの製品については、各製品の適用方法を考慮した上で必要に応じて力学的適合性を確認するための規格を設定すること。

(7) 製品の安定性試験

ヒト軟骨細胞加工医薬品等及びヒト間葉系幹細胞加工医薬品等の最終製品又は重要なそれらの中間製品について、保存・流通期間及び保存形態を十分考慮して、細胞の生存率及び力価等に基づく適切な安定性試験を実施し、貯法及び有効期限を設定し、その妥当性を明らかにすること。特に凍結保管及び解凍を行う場合には、凍結及び解凍操作による製品の安定性や規格への影響がないかを確認すること。また、必要に応じて標準的な製造期間を超える場合や標準的な保存期間を超える長期保存についても検討し、安定性の限界を可能な範囲で確認すること。ただし、製品化後直ちに使用するような場合はこの限りではない。

また、原材料・中間製品および最終製品を運搬する場合には、それぞれの条件と手順(容器、輸送液、温度管理等を含む)等を定め、その妥当性について明らかにすること。

(8) 細胞の造腫瘍性・過形成

製品中の細胞に由来する腫瘍は適用部位における物理的障害となる恐れがあること及び宿主の正常な生理機能に対し悪影響を及ぼす可能性があること等から、悪性腫瘍のみならず良性腫瘍を含む腫瘍形成および過形成の可能性を検討すること。試験により造腫瘍性を評価する方法としては例えば核型分析、軟寒天コロニー形成試験、免疫不全動物における腫瘍形成能試験等が挙げられる。また、既定の培養期間を超えて培養した細胞について、目的外の形質転換や増殖速度の異常亢進がないことを明らかにすることも重要である。なお、免疫不全動物における腫瘍形成能試験においては、移植した細胞が体内で軟骨を形成した場合も一見、腫瘍のように見えることがあるので、形態的特徴だけでなく組織病理学的特徴による評価も検討すること。間葉系幹細胞など、軟骨細胞へと分化しうる細胞または分化した軟骨細胞を含んだ細胞・組織加工医薬品等の造腫瘍性については、免疫不全動物への移植試験だけでなく、複数の試験法による評価の必要性を検討すること。核型分析、免疫不全動物における腫瘍形成能試験については、それぞれ An International System for Human Cytogenic Nomenclature (ISCN2005)、WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-seventh Report (1998)等を参考にすることが考えられるが、試験法の妥当性については、製品の特性やその時点での技術レベル等に応じて検討を行うこと。なお、核型分析において細胞・組織を採取したドナーの年齢や原疾患によっては、ある頻度で染色体異常が生じている場合があるので、染色体異常が認められた場合にそれがドナー背景に起因するのか、あるいは培養に起因するのかを明らかにできるような試験計画の立案を検討すること。

(9) 効能試験

軟骨再生を目的とした細胞・組織加工医薬品等の最終製品の有効性を評価するためには、組織学的検討や生化学的検討だけでなく、体内に投与した後の製品の力学的特性を定量的に検討する必要がある。最終製品の段階で軟骨組織と類似した力学特性を持つことを期待する組織工学的手法により製造された製品の場合には、直接的に粘弾性特性等の力学的特性を測定することにより、製品の体内における効能を投与前に予測ないし評価することが可能かもしれない。一方、組織工学的手法によらず軟骨組織とは類似しない力学特性を持つ製品については、体内における有効性の代替指標（Surrogate Marker）を同定し、効能試験に応用することが考えられる。例えば、タイプIIコラーゲン／タイプIコラーゲンの遺伝子発現比は軟骨細胞の分化の指標とされることがある。ただし、代替指標の使用に際しては、患者における有効性と代替指標との相関性を予め明らかにすることが必要となる。適用後に体内での増殖及び分化等を期待する場合には、設定された基準による継代数又は分裂回数で期待された機能を発揮することを明らかにすること。

6. 効力または性能を裏付ける試験について

一次薬力学試験（Primary Pharmacodynamics / Proof-of-Concept Study）として、ヒト軟骨細胞加工医薬品等又はヒト間葉系幹細胞加工医薬品等の機能発現、作用持続性及び医薬品等として期待される臨床効果の実現可能性（Proof of Concept）を示すこと。また、適当な動物由来細胞・組織製品モデル又は関節疾患モデルがある場合には、それを用いて治療効果を検討すること。治療効果の評価方法には例えば ICRS スコア、O'Driscoll スコア、Wakitani スコア等を利用することが考えられるが、妥当性については検討を行うこと。

7. 体内動態について

いかなる細胞・組織加工医薬品等においても製品に由来する細胞が意図しない生体内分布を示すかどうかは安全上の懸念となる。従って、ヒト軟骨細胞加工医薬品等又はヒト間葉系幹細胞加工医薬品等を構成する細胞・組織についても、技術的に可能で科学的合理性のある範囲で、実験動物での分布、吸収、遊走、生着等の体内動態に関する試験を実施すること。試験を実施しない場合には、その妥当性を示すこと。

8. 臨床試験（治験）

臨床データパッケージおよ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づけ等に応じて、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。

9. 参考文献

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
平成20年2月8日薬食発第0208003号
2. ヒト（同種）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
平成20年9月12日薬食発第0912006号
3. Guidance for Industry
Preparation of IDEs and INDs for Products Intended to Repair or Replace Knee Cartilage
U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for
Biologics Evaluation and Research Center for Devices and Radiological Health, 2007
4. Reflection Paper on
In-Vitro Cultured Chondrocyte Containing Products for Cartilage Repair of the
Knee, Committee for Advanced Therapies (CAT), Doc. Ref.
EMA/CAT/CPWP/288934/2009
<http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/cpwp/28893409en.pdf>
5. Assessment Report for ChondroCelect, European Medicines Agency, Evaluation
for Medicines for Human Use, EMA/724428/2009
<http://www.ema.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/chondrocelect/H-878-en6.pdf>
6. ヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する研究
「ヒト（自己）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針案（中
間報告）」あるいは「ヒト（同種）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に
関する指針案（中間報告）」再生医療 9, 116-138 (2010)

IV. 調査事項

1. 関節軟骨再生評価指標調査報告
2. 関節軟骨再生製品についての生体適合性を含めた生物学的安全性評価の考え方
3. Mechanical testing（侵襲的方法も含む評価法全般）について
4. 実験動物・疾患モデルの選択について
5. 臨床研究に関する報告

関節軟骨再生評価指標調査報告書

国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部
佐藤 陽治

1. はじめに

平成 21 年度の次世代医療機器再生医療審査ワーキンググループ（関節軟骨再生評価指標）の委員として、関節軟骨再生を目的とした細胞・組織加工医薬品等、特に細胞・組織加工医薬品等における、細胞・組織の安全性・品質を確保するために必要な評価指標に関して調査を行った。本調査報告書には、ワーキンググループが提出する関節軟骨再生評価指標（案）へと反映されているが、さらに補足的情報も含まれている。

2. ワーキンググループが提案する評価指標の対象

ワーキンググループが提案する評価指標は、損傷関節軟骨等の治療を目的として適用されるヒト軟骨細胞加工医薬品等又はヒト間葉系幹細胞加工医薬品等について、基本的な技術要件に加えて品質、有効性及び安全性の評価にあたって留意すべき事項を示したものである。現時点ではヒト ES 細胞、iPS 細胞等の多能性幹細胞由来の製品および異種細胞・組織由来の製品は本評価指標の対象とはしない。

3. ワーキンググループが提案する評価指標の位置づけ

細胞・組織加工医薬品等の種類や特性、臨床上の適用法は多種多様であり、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、本評価指標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、本評価指標は申請内容に関して拘束力を有するものではなく、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。なお、本評価指標の他、「ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の指針」、「ヒト（同種）由来細胞・組織加工医薬品等の指針」および国内外のその他の関連ガイドラインを参考にすることも考慮すべきである。

4. 用語の定義

本評価指標における用語の定義は、ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の指針及びヒト（同種）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) 軟骨細胞：軟骨の細胞外基質中に存在し、主にコラーゲン(II, IX, XI 型等)とプロテオグリカン(アグリカンを主とする)を分泌し軟骨基質を形成することを特徴とする細胞を一般的には指すが、本評価指標ではその前駆細胞(軟骨芽細胞)も含み、また、軟骨細胞ないし軟骨芽細胞を豊富に含む細胞集団も指す。また、体外でこれらの細胞を培養して得られた細胞を含む。

(2) 間葉系幹細胞：間葉系組織中に存在し、多分化能を有しかつ自己複製能力を維持しているもの又はそれに類することが推定されるもの、およびこれを豊富に含む細胞集団を言うが、本指針では骨髄間質細胞も含む。また、体外でこれらの細胞を培養して得られた細胞を含む。

5. 評価にあたって留意すべき事項

損傷関節軟骨等の治療を目的とした細胞・組織加工医薬品等には、原材料と適用との関係性から、1) 原材料として採取されるドナーの細胞・組織が患者の適用部位の細胞・組織と同様の基本機能をもつ場合(相同使用 Homologous Use)と、2) そうでない場合(非相同使用 Non-homologous Use)とに分けられる。本評価指標においては昨今の国内外の研究開発状況を鑑み、前者の場合には主にヒト軟骨細胞加工医薬品等、後者の場合には主に軟骨以外の組織に由来するヒト間葉系幹細胞を原材料とする細胞・組織加工医薬品等を対象とする。両者の安全性・有効性上の大きな差異は、前者の場合には適用部位における細胞組織の既知の生理学的機能からその有効性の機序を理解することが比較的容易であるのに対し、後者の場合には移植段階で軟骨細胞様の表現型を呈さない場合がある点、および有効性を裏付ける機序が複数である可能性とそれらの同定が困難であるという点にある。したがって、間葉系幹細胞加工医薬品等に関しては、有効性の評価、その機序の理解、および製品中の細胞の適用部位における機能にもとづくリスクの評価に関し、軟骨細胞の相同使用による軟骨細胞加工医薬品等よりも注意が必要である。

製品評価について、以下に挙げた試験項目が考えられる。しかしながら、製品によっては例示した試験項目又はマーカーが必要十分とは限らず、また逆に不必要な場合もある。さらに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し、使用する妥当性を説明すること。

(1) 細胞数および生存率

出発原料となる軟骨細胞又は間葉系幹細胞は採取組織に由来する量的な制約がある。軟骨細胞は体外培養すると脱分化する傾向を持ち、また間葉系幹細胞も体外培養によりその表現型を変化させる傾向を持つ。いずれの体細胞種も、ドナーの年齢または長期の培養等の条件により増殖速度が低下する場合もあるため、体外での増幅にも限度があり、

最終製品に使用可能な細胞数は、出発原料として得られた細胞の数に応じて量的な制約を持つ。したがって、意図する治療部位のサイズに見合った量の最終製品を製造するために十分な量の細胞を確保するためには、原材料または中間製品中に存在する細胞の数および生存率について判定基準を設定しておく必要がある。また、最終製品における細胞の生存率についても基準を設定すること。

(2) 確認試験

目的とする体内での有効性（軟骨形成能、軟骨機能など）を達成し、かつ安全性上の問題（意図しない分化、過形成、異常増殖など）を可能な限り回避するとともに、一定の品質及び安定性を保持するために必要な、最終製品中の細胞の特性解析指標を定め、これらを用いて最終製品中の細胞が目的の細胞であることを確認すること。組織工学的手法により製造された製品については、マトリックス中、スキャフォールド上などに播種された細胞の生存率・密度・形態学的特徴などを確認すること。なお、最終製品の規格を最も良く実現するために必要な、原材料および中間製品の特性解析指標を設定することも必要である。量的制約や複雑な品質特性のために最終製品において細胞の特性を必要十分に評価できない場合には、中間製品（または原材料）で評価することが選択肢となる場合もある。ただし、そのためには中間製品（または原材料）の特性が最終製品の品質に関する適正な道標となるという合理性を示すことが必要である。

(参考)

細胞特性解析指標としては、形態学的評価、表現型特異的マーカー、核型、細胞増殖特性、多分化能などが挙げられ、必要に応じて試験項目・試験方法・判定基準を設定すること。なお、軟骨細胞のマーカーとしては、例えばタイプ II コラーゲン、アグリカン、Sox9 等の発現量やタイプ II コラーゲン/タイプ I コラーゲン発現比などが知られている。間葉系幹細胞については明確なマーカーが同定されていないが、CD44、CD102 (ICAM-2)、CD105、CD106 (VCAM-1)、CD29 (integrin beta1)、CD58 (LFA-3)、CD73、CD90 (Thy-1)、CD166、STRO-1、その他の種々のインテグリン分子等の発現に関して陽性で、HLA-DR や CD45、CD34、CD14 などの造血系マーカー等の発現に関しては陰性とされている。スキャフォールド等を用いて組織工学的手法により製造された製品では、細胞の増殖活性あるいは細胞数を測定するのは困難な場合もあるが、培地中のグルコースないし酸素の消費速度や乳酸生成速度などは増殖の指標として、また細胞の DNA 量やミトコンドリア酵素活性 (MTT アッセイ等) などは生細胞数の指標として利用できる可能性がある。

軟骨組織の組織学的評価には、アルシアンブルー染色やトルイジンブルー染色、あるいは免疫染色によるタイプ II コラーゲンやプロテオグリカンの検出等が利用可能である。硝子軟骨の場合にはサフラニン O 染色が行われる。

(3) 細胞の純度試験

細胞の純度は品質管理における重要な要素であり、工程評価を通じて規格を設定すべきものである。原材料、中間製品、最終製品の各段階における目的細胞については、確認試験で定めた特性解析指標に基づいて定義すること。混入細胞（例えば骨芽細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞などや、その他の採取時に混入する可能性のある細胞、ないし原材料・製造工程における幹細胞の意図しない分化により生じた体細胞(様)細胞など)、未分化細胞または脱分化細胞、異常増殖細胞、形質転換細胞といった、目的細胞以外の細胞の検出およびその安全性を確認する試験方法および判断基準を設定する。

(4) 細胞の培養期間の妥当性

培養期間の妥当性及び細胞の安定性を評価するために、予定の培養期間を超えて培養した細胞において脱分化ないし多分化能の減弱、もしくは増殖速度の異常変動などの目的外的変化がないことを適切な細胞指標を用いて示すこと。適用後に体内での増殖および分化等を期待する場合には、設定された基準による継代数又は分裂回数で期待された機能を発揮することを明らかにすること。

(5) 非細胞材料および最終製品の生体適合性

製品に関係する非細胞材料については、細胞とともに最終製品の一部を構成するもの（マトリックス、医療材料、スキャフォールド、支持膜、ファイバー、ビーズ等）だけでなく、製造工程中で細胞と接触するものおよび適用時に使用されるもの（局所封入用の膜、フィブリン糊等）に関しても、材料自体の品質・安全性に関する知見について明らかにするとともに、生体適合性等、患者および製品中の細胞との相互作用に関する知見について明らかにすること。また、最終製品総体についても患者の細胞組織、特に適用部位周辺組織との相互作用について評価すること。また、最終製品の一部を構成する非細胞材料の、製造工程中（培地中）および体内での分解特性、体内での再吸収特性、分解物の安全性に関して適切な情報を提供すること。特に、生体吸収生材料を用いる場合には、分解生成物に関して必要な試験を実施すること。非細胞材料の生体適合性については、ISO10993-1, JIS T 0993-1, 又は ASTM F 748-04 等を参考にすること。

(6) 力学的適合試験

組織工学的手法により製造した製品など、最終製品の態様によっては最終製品自体に耐荷重性、摺動特性、粘弾性などにおける適合性が要求される。これらの製品については、各製品の適用方法を考慮した上で必要に応じて力学的適合性を確認するための規格を設定すること。

(7) 製品の安定性試験

製品化したヒト軟骨細胞加工医薬品等およびヒト間葉系幹細胞加工医薬品等又は重要なそれらの中間製品について、保存・流通期間及び保存形態を十分考慮して、細胞の生存率及び力価等に基づく適切な安定性試験を実施し、貯法及び有効期限を設定し、その妥当性を明らかにすること。特に凍結保管及び解凍を行う場合には、凍結及び解凍操作による製品の安定性や規格への影響がないかを確認すること。また、必要に応じて標準的な製造期間を超える場合や標準的な保存期間を超える長期保存についても検討し、安定性の限界を可能な範囲で確認すること。ただし、製品化後直ちに使用するような場合はこの限りではない。

また、原材料・中間製品および最終製品を運搬する場合には、それぞれの条件と手順(容器、輸送液、温度管理等を含む)等を定め、その妥当性について明らかにすること。

(8) 細胞の造腫瘍性・過形成

製品中の細胞に由来する腫瘍は適用部位における物理的障害となる恐れがあることから、悪性腫瘍のみならず良性腫瘍を含む腫瘍形成および過形成の可能性を考察すること。試験により造腫瘍性を評価する方法としては例えば核型分析、軟寒天コロニー形成試験、免疫不全動物における腫瘍形成能試験などが挙げられる。また、既定の培養期間を超えて培養した細胞について、目的外の形質転換や増殖速度の異常亢進がないことを明らかにすることも重要である。なお、免疫不全動物における腫瘍形成能試験においては、移植した細胞が体内で軟骨を形成した場合も一見、腫瘍のように見えることがあるので、形態的特徴だけでなく組織病理学的特徴により評価すること。間葉系幹細胞など、軟骨細胞へと分化しうる細胞または分化した軟骨細胞を含んだ細胞・組織加工医薬品等の造腫瘍性については、免疫不全動物への移植試験だけでなく、複数の試験法により評価を行うことが重要である。核型分析、免疫不全動物における腫瘍形成能試験については、それぞれ An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN2005)、WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-seventh Report (1998)等を参考にすること。なお、核型分析において細胞・組織を採取したドナーの年齢や原疾患によっては、ある頻度で染色体異常が生じている場合があるので、染色体異常が認められた場合にそれがドナー背景に起因するのか、あるいは培養に起因するのかを明らかにできるように試験計画を立案し、結果を解釈することが重要である。

(9) 効能試験

軟骨再生を目的とした細胞・組織加工医薬品等の最終製品の有効性を評価するためには、組織学的検討や生化学的検討だけでなく、体内に投与した後の製品の力学的特性を定量的に検討する必要がある。組織工学的手法により製造された製品の場合には、直接的に粘弾性特性等の力学的特性を測定することにより、製品の体内における効能を投与

前に予測ないし評価することが可能かも知れない。一方、組織工学的手法によらない、軟骨組織とは類似しない力学特性を持つ製品については、体内における有効性の代替指標 (Surrogate Marker) を同定し、効能試験に応用することが考えられる。例えば、タイプIIコラーゲン/タイプIコラーゲンの遺伝子発現比は軟骨細胞の分化の指標とされることがある。ただし、代替指標の使用に際しては、患者における有効性と代替指標との相関性を予め明らかにすることが必要となる。適用後に体内での増殖および分化等を期待する場合には、設定された基準による継代数又は分裂回数で期待された機能を発揮することを明らかにすること。

6. 効力または性能を裏付ける試験について

一次薬力学試験 (Primary Pharmacodynamics / Proof-of-Concept Study) として、ヒト軟骨細胞加工医薬品等又はヒト間葉系幹細胞加工医薬品等の機能発現、作用持続性及び医薬品等として期待される臨床効果の実現可能性 (Proof of Concept) を示すこと。この際、試験検体のドナーの情報や、製造工程中の培養細胞の分裂回数ないし継代数、および細胞の純度等に関する情報と対比することが、製造工程および製品規格の最適化には有益かもしれない。また、適当な動物由来細胞・組織製品モデルまたは関節疾患モデルがある場合には、それを用いて治療効果を検討すること。治療効果の評価方法には例えばICRSスコア、O' Driscollスコア、Wakitaniスコア等がある。

一次薬力学試験の実施時に、被検製品に含まれる細胞による副次的薬理効果が考えられる場合には、二次薬力学試験を実施する。

7. 体内動態について

いかなる細胞・組織加工医薬品等においても製品に由来する細胞が意図しない生体内分布を示すかどうかは安全上の懸念となる。したがって、ヒト軟骨細胞加工医薬品等又はヒト間葉系幹細胞加工医薬品等を構成する細胞・組織についても、技術的に可能で科学的合理性のある範囲で、実験動物での分布、吸収、遊走、生着等の体内動態に関する試験を実施すること。試験を実施しない場合には、その妥当性を示すこと。

8. 臨床試験

臨床データパッケージおよび治験実施計画書は、対象疾患、目的とする効能および効果、当該治療法に期待される臨床上の位置づけ等に応じて、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。

9. 参考文献

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

(平成20年2月8日薬食発第0208003号)

2. ヒト(同種)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
(平成20年9月12日薬食発第0912006号)

3. Guidance for Industry: Preparation of IDEs and INDs for Products Intended to Repair or Replace Knee Cartilage

(U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research Center for Devices and Radiological Health, 2007)

4. Draft Reflection Paper on In-Vitro Cultured Chondrocyte Containing Products for Cartilage Repair of the Knee

(European Medicines Agency, EMEA/CAT/CPWP/288934/2009)

5. Public assessment report: Assessment Report for ChondroCelect

(European Medicines Agency, EMEA/724428/2009)

関節軟骨再生製品についての生体適合性を含めた 生物学的安全性評価の考え方

国立医薬品食品衛生研究所
療品部
松岡 厚子

医療機器の承認申請に当たっては、主に、臨床試験の開始に先だって製品の安全性が許容範囲にあることを実証するために、生体適合性を確認しておく必要がある。そのためには、非臨床試験の中の *in vitro* 及び *in vivo* 毒性試験、言い換えれば生物学的安全性試験を実施する必要がある。ここで、誤解を与えないために説明しておくが、これまでに当該製品の安全性を担保するデータあるいは参考文献等があればそれを利用することが可能であり、それらのデータがない時に初めて試験の実施が必要になる。

関節軟骨再生製品の場合、試験サンプルとして、細胞成分、非細胞成分及び前2者を含む最終製品の3種類が考えられる。

1. 細胞成分

本WGでは細胞ソースとして、軟骨細胞及び間葉系幹細胞を考えている。細胞成分の生物学的（非臨床）安全性評価のためには、ヒト自己指針 [1] およびヒト同種指針 [2] のそれぞれ「第4章細胞・組織加工医薬品等の非臨床安全性試験」を参照する。また、細菌、真菌、ウイルス、エンドトキシン、マイコプラズマの混入を否定するためには、両指針のいずれも「第2章第3 2(6) 無菌試験及びマイコプラズマ否定試験、(7) エンドトキシン試験、(8) ウィルス試験」を参照する。

培養による目的外の変化（腫瘍化、不適切な分化等）がないことの確認については、ヒト自己指針「第2章第2 3 加工した細胞の特性解析」並びにヒト同種指針「第2章第2 2(5) 株化細胞の樹立と使用」を参考に必要な試験を選択する。要約すると、現時点の科学水準では、ヌードマウスを用いる造腫瘍性試験、軟寒天コロニー法、核型解析の試験が考えられるが、これらの試験結果の判定基準についてはふれていない。むしろ、試験実施者がそれらの規格を設定するよう求められている。現時点での解釈としては、結果が陽性になったことは、直ちに製品の不適を意味するものではなく、安全性担保のためにこれらのデータを示すことが必要とされていると考えるべきであろう。製品の安全性は、あらゆる情報を総合して行われるリスク評価により評価される。

上記指針の他、現在 ISO/TC 194 /SC 1 において関連文書が国際標準を目指して策定中である [3] 。製品を海外で販売する場合には、国際標準を使用することも考えられるので、この文書の策定動向を注視する必要がある。

2. 非細胞成分（動物組織由来材料を含む）

一般的な医療機器を対象とした場合、その使用によって起きる潜在的な生物学的リスクからヒトを護ることを目的に、ヒトの身体に直接的又は間接的に接触する医療機器について、生物学的安全性評価に関する標準、指針等が作成されている。それらによれば、生物学的安全性については、主に使用されている材料の人体との接触形態、接触部位、接触期間によって考慮すべき試験が示されている。間接軟骨再生製品は、軟骨部位に 30 日以上埋植する医療機器という分類になり、細胞毒性試験、感作性試験、遺伝毒性試験、埋植試験が考慮すべき試験となる（医薬審発第 0213001 号 [4]）。これらは決して「実施すべき試験」ではない。また、使用目的によっては、他の試験を実施することが適切な場合もある。

例えば、(独) 医薬品医療機器総合機構のホームページから入手できる審査報告書に、多孔性ゼラチン粒（販売名：ジェルパート）がある。使用目的は「肝細胞癌患者に対する肝動脈塞栓療法」となっている。人体との接触形態、部位、期間の観点からすれば、考慮すべき試験は、細胞毒性試験、感作性試験、刺激性試験、全身毒性試験、亜急性毒性試験、遺伝毒性試験、発熱性、埋植試験、血液適合性試験であるが、実際に実施された試験は細胞毒性試験、感作性試験、全身毒性試験、遺伝毒性試験、血液適合性試験の 5 種の試験であった。

関節軟骨再生においてゲルやスポンジを使って三次元培養をする場合、例えばアテロコラーゲンを使用する場合もあると考えられるが、既承認品があれば、ヒトに対する安全性は既に確認されているので、当該製品で非臨床安全性試験を実施する必要はない。しかし、臨床で使用する時には適用外使用にならないことの確認が必要である。

本 WG での議論にでてきたフィブリン糊は国内では血液製剤、つまり医薬品として承認されているが、その効能効果は「組織の接着・閉鎖」となっている。関節軟骨再生の目的で使用細胞を治療部位に留めるために使用することは適用外使用となり、薬事法ではその使用は認められないが、臨床研究での医師の判断による使用を妨げるものではない。将来治験を経て実用化を目指す場合には、適用外使用に対する対策をしておく必要がある。

それ以外の医用材料を使用する場合も類似の注意が必要であろう。例えば、細胞を治療部位に留める別の方法として膜で覆うことが考えられるが、使用している膜が医療機

器として承認されているか、またその適用範囲についても確認しておく必要がある。

3. 細胞成分および非細胞成分を含む最終製品

ここでは、最終製品として、足場の上で三次元に培養製造された製品を考える。当該製品は医療機器として分類されるが、製品の大部分は細胞から構成され、通知医薬審発第 0213001 号に記載されている原材料の定義とは異なることから、当該通知中に規定される試験は、当該製品には馴染まないと考えられる。むしろ、ヒト由来成分を原料として製造される医療機器と考えられるので、1314 号通知 [5]、ヒト自己指針及びヒト同種指針に従うことになる（1. を参照）。

加えて、足場として使用した材料単独について、通知医薬審発第 0213001 号に規定される必要な生物学的安全性試験を実施すれば（2. を参照）、最終製品の安全性はより担保されると考えられる。

現時点では、細胞と医用材料が一体となった最終製品の非臨床安全性評価を行うための、一般的に確立された試験法はなく、今後の開発が望まれる。

4. 関連する国際標準及び各国規制

医用材料（合成又は天然高分子化合物、金属、合金、セラミックス又はその他の化学物質等）の生物学的安全性評価のための国内通知として、医薬審発第 0213001 号がある。国際標準としては、ISO 10993-1 [6]（翻訳 JIS T 0993-1 [7]）、また米国規制としては ASTM F748-04 [8] がそれに相当する。いずれも、医療機器の分類毎に考慮すべき試験の選択についてのガイダンスを提供している。各試験法の詳細を記載した文書を同じシリーズ内に揃えているという形式も同じである。

関節軟骨再生製品の足場として使用される可能性のある動物組織由来材料も含めた医用材料については、上記の通知等に従って必要な試験を実施する。

規制一般について、国内規制、国際標準等があるが、グローバル化が進んでいる現代では海外市場での販売を考えれば、国際標準を見過ごすことはできない。しかしながら、国内では当然国内規制が優先されるわけで、混乱が生じないように、これら規制の整合化を図る努力が専門家によりなされている。

言い換えれば、例えば細胞成分の安全性評価法として国内で優れた規制等を作成でき、その内容を盛り込んだ標準化文書を提案し ISO 文書にできれば、日本の製品の国際競争力を高めることができると考えられる。

参考資料

1. 平成 20 年 2 月 8 日付薬食発第 0208003 号厚生労働省医薬食品局長通知 ヒト(自己)由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について
2. 平成 20 年 9 月 12 日付薬食発第 0912006 号厚生労働省医薬食品局長通知 ヒト(同種)由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について
3. ISO/CD 13022.2 Application of risk management to medical products containing viable human cells (平成 22 年 3 月現在討議中)
4. 平成 15 年 2 月 13 日付医薬審発第 0213001 号厚生労働省医薬局審査管理課長通知 医療用具の製造(輸入)承認申請に必要な生物学的安全性試験の基本的考え方について
5. 平成 12 年 12 月 26 日付医薬発第 1314 号厚生省医薬安全局長通知 ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について
6. ISO 10993-1:2009 Biological evaluation of medical devices - Part 1: Evaluation and testing within a risk management process
7. JIS T 0993-1:(2010 予定) 医療機器の生物学的評価—第 1 部: リスクマネジメントプロセスにおける評価及び試験
8. ASTM F 748-04 Standard Practice for Selecting Generic Biological Test Methods for Materials and Devices

Mechanical testing (侵襲的方法も含む評価法全般) について

東京大学医学部・大学院医学系研究科 附属
疾患生命工学センター 再生医療工学部門
牛田 多加志

関節軟骨組織は、骨端に存在し、関節に負荷される荷重を支え、また関節の滑らかな摺動を可能にしている組織であり、関節軟骨の特性において、力学的特性は最も重要な項目の一つである。従って再生関節軟骨組織の評価においても、その力学的特性評価は同じく重要である。

そもそも再生組織は、大量生産品と異なり、再生組織ごとにその組織形成度、力学的特性等は異なるため、一品一品独立して評価する必要がある。したがって、力学的特性評価試験も含め、評価試験は非破壊的、非侵襲的であることが求められるが、ここでは侵襲的な評価方法について記述する。

1) 関節軟骨組織の粘弾性

関節軟骨は、組織の60～87%は水分子で構成されており、その残りは細胞とマトリックスとで構成されている。マトリックスは、コラーゲンとプロテオグリカンとで構成されている。コラーゲンは、関節軟骨の力学的特性のうち、バネ弾性を受け持っていると考えられており、一方、プロテオグリカンは、コンドロイチン硫酸やケラタン硫酸のように硫酸基を持つっており、そのマイナスチャージに水分子が配向し、水分子を拘束する結果、流動変形に対する抵抗である粘性を示す。関節軟骨は、このように弾性と粘性とを併せ持つ性質、いわゆる粘弾性を有する。したがって、再生関節軟骨組織の力学的特性評価においても、この粘弾性評価が重要な評価項目となる。

2) 応力緩和試験とクリープ試験

材料の粘弾性を評価するためには典型的な2つのパラメータが存在する、一つは応力緩和であり、もう一つはクリープである。応力緩和とは、一定のひずみを組織に負荷したときに、発生する応力が時間と共に次第に緩和、すなわち漸減していく現象のことを示している、これは組織が弾性だけではなく粘性を有していることが原因である。一方、クリープとは、組織に一定の応力を負荷した時に、発生するひずみが時間とともに漸増していく現象である、この現象も組織が弾性だけではなく粘性を有していることが原因である。この2つのパラメータを評価する試験がそれぞれ応力緩和試験とクリープ試験である。

3) 静的力学特性評価試験

一般的な力学試験装置は、一定の応力またはひずみを負荷する機能に限定されている。したがって、再生軟骨組織の力学的特性評価としては、第一に静的な力学特性評価が行われる。ここでは応力緩和試験を例にとり概説する。まずサンプルはPBSに浸された状態でインデンターを介して、一定のひずみが負荷される。この際、サンプルの側方は一般的には拘束しない。サンプルの初期厚さを計測するために、プリロード（例えば0.02N, 5 min.）を行う。ひずみの負荷は、例えば一分間に0.5%の割合で段階的に20%までひずみを負荷し、20%で例えば2400秒保持する。20%までひずみを負荷した時点での応力をピーク応力、そして保持直後の応力を平衡応力として測定する。静的力学特性評価のパラメータとしては、平衡弾性係数があり、上述の負荷ひずみ量と測定された保持直後の応力とから計算される。

4) 動的力学特性評価試験

関節軟骨組織は、運動や歩行等で動的に荷重が負荷されている。したがって、再生関節軟骨組織の力学的特性評価においても、動的な評価試験法が求められる。動的な試験においては、一定のひずみをオフセットしてプリロードしておき、そのひずみを中心として動的ひずみを負荷する。ひずみの負荷方向によって、動的圧縮試験と動的ねじり試験の2種類が存在する。動的圧縮試験の場合は、負荷ひずみと計測された応力とから計算される動的弾性係数および負荷ひずみと計測された応力との位相差に相当する損失正接の2つのパラメータによって動的な力学的特性の評価を行う。この2つのパラメータは、負荷されたひずみの周波数に依存して変動する。

実験動物・疾患モデルの選択について

東海大学医学部外科学系整形外科学

佐藤 正人

様々な動物を用いて関節軟骨の修復・再生の研究が広く行われているが、過去に報告されている実験動物・疾患モデルがどういう根拠で選択され、実施されたのかを検証し、実施を計画している臨床試験と鑑みて、適切な実験動物、疾患モデルを選択し、意味のある研究結果を蓄積する必要がある。

【動物種の観点から】

Chu(1)は、齧歯類はコストの面からも *in vitro* の研究と前臨床試験としてのトランスレーショナルリサーチに適していると報告しているが、小動物では関節は極めて小さく、手術手技（細胞移植や組織工学的組織等の移植手術を含む）が影響を及ぼすような治療法の評価として、必ずしも適しているとは言えない。

以下に各動物種の利点と欠点を示す。

マウス

胸腺欠損マウス、遺伝子組み換えマウス、ノックアウトマウスなどの研究が可能であり、飼育が簡便である。また、免疫不全マウスの使用は、同種異系、もしくは異種の細胞および組織を含む研究が実施可能である。またマウスには自然発症する関節炎系、老齢系になど豊富な種類の遺伝子改変マウスがあり、特定の遺伝子またはタンパク質の過剰発現や欠損が軟骨修復・再生に影響を与える研究にとって大きなメリットがある。しかしながら、一方で関節が極めて小さく、関節軟骨も薄いため、手術手技が影響を与えるような治療法の実験としては実際的ではない。

ラット

マウスより関節が大きく、飼育が簡便であり、コストの面からも適している。Watrin-Pinzano(2)は、8.5T MRI imaging system を用いてラットの膝蓋骨の軟骨欠損の自然修復を評価した。齧歯類では、免疫不全および遺伝子組み換えモデルも使用できるため魅力的なモデルである。しかし、ラットは成長板が生涯残存するため、関節のサイズや薄い軟骨など手術手技を行う際には、種特異的な内因性の影響を受ける可能性がある。また関節の修復・再生が容易である可能性がある。

ウサギ

ウサギは軟骨再生の研究に広く用いられてきた。それは取り扱いやすさと、コストの安さに基づいている。またウサギは多くの小動物と同じように、遺伝子型が同様の動物を作製し研究が可能である。軟骨修復の研究が行われるようになった当初、ウサギは3-4mmの欠損が作製できるため、広く用いられていた。当初、移植による修復と、内因性の修復限界の研究の両方が可能であると考えられていた。しかし Wei, X らはウサギの著明な内因性修復の可能性を示した(3)。Shapiro らはウサギを用いて、軟骨修復が残存、隣接する軟骨細胞からではなく、骨髄からの間葉系細胞の増殖と分化によってもたらされることを示した(4)。以上より、ウサギはコスト面や関節の大きさなどから軟骨欠損の研究には適しているかもしれない。

イヌ

ヒトと同様に自己修復能に乏しく、変形性関節症や、離断性骨軟骨炎を生じる。イヌはマウス、ラット、ウサギに比べ、よりヒトに近いモデルとしての可能性がある。軟骨の厚さも十分であり、部分欠損の検討も可能である。また、大きな関節腔を有し、関節鏡も可能であり、リハビリテーションプロトコルを義務付けているような研究に適している。しかし、イヌはヒトとの結びつきが強い動物であり、倫理的観点からの問題がある。これらの懸念から、動物の使用を減らしたり、研究用に育てられるイヌを使用するに至った過去の経緯がある。術後リハビリテーションプロトコルが必要な研究には、イヌは最適かもしれないが、手術手技評価の研究には関節サイズが小さい懸念がある。

ヤギ

関節の大きさ、軟骨、軟骨下骨の硬さが十分あり、関節鏡も可能である。欠損サイズを大きくすることも容易であり、軟骨下骨と軟骨の比率や軟骨下骨の硬さがイヌやヒツジに比べヒトに近い。海外では大規模な施設があり、他の大型動物より比較的安価かつ飼育が容易であることもある。Niederauer(6)は、全層欠損の修復の研究を行い、硝子様軟骨での修復を示した。しかし、リハビリテーションで決められた荷重や運動を研究するには不向きである。自己由来フィブリンを準備するためには、ほとんど1匹全ての血液容量を処理する必要のため、ヤギはコストの面から考えても実用的ではないとする報告もある(7)。

ブタ・ミニブタ

関節の大きさ、荷重、関節軟骨の厚さなどはイヌや他の小動物に比べヒトに近い。にもかかわらず、今まであまり使用されていない。なぜなら、ブタが大きく比較的攻撃的であり、研究施設で扱うことが困難なためである。更に、急激な体重増加の時期があり、離断性骨軟骨炎を高率に生じやすい。骨格的に成熟するには24カ月以上とも言われ、種類にもよるが体重200kg近くになるものもあり、性成熟をもって実験に用いるのが現実的で

あろう。しかし、ミニブタの使用はこれらの問題を克服するかもしれない。研究用に育てられたミニブタは通常従順で、体重も成人男性と同等位にまで育てることも可能である。軟骨修復には内因性の影響を受ける可能性があり、性成熟に達したミニブタを用いることが重要であるが、ミニブタの種類によっては、生後 12 カ月程度で成長板が閉鎖し骨格的に成熟するものもある。大きな欠損が作製可能であり、軟骨が約 1.5mm 程度はあり、部分損傷、全層欠損いずれも作製可能であり、関節鏡も可能であろう。また血算、生化学などのパラメータがヒトと同様である。しかし、コストが高く、飼育可能な施設は限定される。

ウマ

軟骨修復、軟骨の厚みがヒトに近く、全層欠損、部分欠損の研究に適している。15~20mm の骨軟骨欠損も作製でき、内因性の影響を受けにくいとされている。またウマの膝関節はヒトとほぼ同様の構造であるが、軟骨下骨が非常に硬い。また、飼育施設が極めて限定されるため、一般的な研究には向かないかもしれない。

以上より、マウス、ラット、ウサギ、イヌはコスト、飼育の簡便さの点から、アカデミックでの研究に適している。適切な疾患モデルを選べば、ウサギ、イヌ、ヤギ、ブタ、ミニブタ、ウマ等は関節の大きさ、軟骨の厚さ等が十分であり、研究に適している。大型動物(ヤギ、ブタ、ミニブタ、ウマ)は飼育施設が限定され、コストの面からもアカデミックでの研究に用いることは難しいが、将来製品化を目指す場合は、前臨床試験として、実施することが望ましい。コスト、飼育、施設、倫理的観点等を考慮したうえで、日本では、ウサギまたはミニブタが軟骨損傷モデルとしては最適であると考え、各動物モデルの利点、欠点は様々であり、疾患モデルとして適切な動物モデルを選択することが最も重要である。

【疾患モデルの観点から】

軟骨全層欠損（骨軟骨損傷）モデル

Brittberg(8)は、生後 4 ヶ月、体重 3.5~4.3kg のニュージーランド白色家兎を 51 頭使用し、膝蓋骨に 3mm の欠損を作製し全層欠損修復の評価を行った。実験期間は 8 週から 52 週と設定した。軟骨細胞で移植された膝蓋骨の再生する組織は、白っぽく、平滑で、周囲の関節軟骨に類似していた。骨膜のみの群は不均一な修復であった。担体+骨膜のみの群も同様に不均一な修復であり、担体は分解されていた。細胞移植群では 2 種類の細胞回収の方法で検討したが、トリプシン処理回収群と機械的回収群の間に組織学的にも肉眼的にも修復効果に有意な差は認めなかった。細胞+骨膜群、細胞+scaffold+骨膜群共には、細胞移植していない骨膜単独群と比較して良好な修復組織が認められた。細胞+骨膜群と scaffold+細胞+骨膜群間の修復効果に有意な差は認めなかった。また、骨膜単独群には修復効果

は認めなかったとしている。

Breinan (9)はイヌを用いて全層欠損モデルの評価を行った。生後 24 ヶ月～36 ヶ月、体重約 30kg の雑種犬 14 匹を術前に X 線撮影にて関節症性変化がないことを確認したうえで、全層欠損作製し使用した。両側大腿骨(Trochlear groove)に 2 箇所(8 匹)、片側大腿骨に 2 箇所(6 匹)、計 44 箇所に 4mm の欠損を 2 箇所ずつ作製し、12～18 ヶ月観察し、評価した。細胞＋骨膜移植群と骨膜単独移植群の間に軟骨修復の差は認めなかったとしている。

Brehm (10)は生後 36 ヶ月、平均体重 60kg の 9 匹のヤギを用いた。大腿骨(left trochlea femoris)に直径 6mm 深さ約 0.8mm の欠損を 4 箇所作製し、4 週間関節をギプス固定した。また、移植時に欠損部から小出血点を確認した。観察期間は 8 週とした。骨膜なしのものは移植注入物が失われており、組織学的には線維性組織を認めた。培養細胞＋Human fibrin glue(FG)＋骨膜を移植した群は、移植細胞、骨膜共に脱落が見られ、培養細胞＋Platelet-rich plasma(PRP)＋骨膜移植群では、一部に移植細胞、骨膜、が残存する程度であった。培養細胞＋骨膜を移植した群は比較的良好な成績であり、FG、PRP の使用は有効ではなかったとしている。

上述のように、様々な動物でのモデルで軟骨の修復再生効果は検討されている。Breinan(9)、Brehm (10)らは大型動物を使用しているとはいえ、同一関節内に複数の欠損部を作製しており、欠損部や移植細胞が様々な影響を受ける可能性を否定できない。そのため、疾患モデルとして、同一関節内に複数の欠損を作製することは好ましくない。

軟骨部分損傷モデル（外傷性変形性関節症モデル）

Yoshioka(11)らは骨端線が閉じた生後 14±2 ヶ月、体重 4.4±0.5kg のメスのニュージールランド白色家兎 30 頭を用いて膝前十字靭帯切除モデル(ACLT モデル)を作製し軟骨損傷を評価した。対側の膝は関節切開のみ施行し、それぞれ 3 群に分け、術後は関節固定せずゲージにて経過観察された。感染や他の合併症が生じた場合は中止とした。各群術後 4 週、8 週、12 週で犠牲死させ評価した。すべての膝で関節炎がみられ、時間経過とともに重症化していた。4 週では部分欠損はみられたが、全層欠損は見られなかった。8 週での 4/10 例と 12 週時点での 6/10 例で潰瘍様の全層欠損を認めた。全層欠損は内側で多く認めた。また、何匹かは外側半月板損傷、後内側半月板損傷も認めた。線維軟骨様修復は内側で多くみられた。8 週の関節軟骨表面の状態は 4 週よりも粗かった。4 週での対側のシャム群との比較では、2/10 例は軟骨の厚さに肥厚を認めた。サフラニン O 染色では線維性組織の部位で染色性の減少を認めた。4 週では滑膜組織下に単核球が浸潤し、滑膜表層細胞の増殖を示した。対側のシャム群と比較し、滑膜表層細胞は 2～3 倍厚かった。各時間の比較で、関節滑膜表層細胞の厚みが時間とともに減少することが明らかになった。同時に、滑膜細胞層の下にある線維化は時間経過と共に増加した。8 週と 12 週を比較して、潰瘍部分の大きさは 8 週が明らかに小さかった。また 12 週では、滑らかな軟骨下骨が露出しており、8

週の欠損部のほうが粗かった。

Kikuchi(12)は 72 頭のニュージーランド白色家兎を用いて、半月板損傷モデル(Colomboモデル)を作製し、分子量の異なる2種類のヒアルロン酸(HA)投与後2週、4週で修復再生効果を検討した。HA80 (0.8×106 Da, 1%)、HA190 (1.9×106 Da, 0.01-1%)と生理食塩水を比較検討したが、2週で、軟骨変性の変性抑制効果は、HA80 より HA190 で有意に大きいと報告した。

【軟骨欠損部の大きさについて】

欠損部の大きさも様々であるが Shapiro らはウサギを用いて3mmの欠損部が自然修復し得ると報告した(4)。Jackson(5)はスペインヤギを用いて6mmの欠損部は自然修復しないと報告した。動物種により、自然修復可能な欠損の大きさは異なることは容易に予想されるが、今後は4-6mmの欠損を作製し評価すべきかもしれない。

【片側性か両側性か】

これまでの動物実験では、両側の外科的手術を行い検討している報告が散見されるが、片側だけを手術した場合と両側を手術した場合では明らかに侵襲も術後の疼痛も異なり、必要な安静度や局所の保護の仕方も異なると考えられる。Driesang and Hunziker(13)はヤギを用いて自家培養軟骨移植時の骨膜フラップの影響をみるために術後の関節固定について言及しているが、術後にバンテージで固定するために、片側性モデルを使用している。さらに大型動物であれば3脚で歩行可能であり、手術した脚を保護できる点、侵襲と不快が限定的であり全身性の影響を受けにくい点などが考えられる。臨床応用時のリハビリテーションを考慮したようなモデルが必要かもしれない。

【形態学的、組織学的評価方法】

関節の形態学的、組織学的評価は一般的に Mankin score(14)、International Cartilage Repair Society (ICRS) grading(15)、Wakitani score(16)、Osteoarthritis Research Society International (OARSI) scoring(17,18)などが一般的に用いられている。

【意味のある動物実験のために】

動物実験においては、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保育並びに苦痛の軽減に関する基準」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」並びに「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」等を遵守し、動物愛護の精神に基

づいた十分な配慮がなされなければならず、無駄な動物実験は極力回避すべきである。例えば、「安全性の評価」で免疫不全動物の皮下に細胞を投与して評価することは、理解できるが、それとは別に「効力または性能を裏付ける試験」として、ヌードマウスの皮下にヒト細胞を移植し、評価するようなことは軟骨再生の評価としては推奨できるものではない。骨髄幹細胞や滑膜由来幹細胞を高密度で関節内に投与すると、軟骨修復・再生効果があることは確認されている。しかしながら、ヌードマウスの皮下にこれらの細胞をそのまま投与して軟骨が形成されるかという、分化誘導をかけない限りは軟骨形成には至ることはない。つまり、関節内という特殊環境下での **site dependent** な効果の判定を、他の部位に投与して判定するという評価方法そのものが適切ではない。恐らくは、関節内の特殊環境に応じた幹細胞の分化や液性因子等の作用により、軟骨の修復・再生効果をもたらされるものと推察されるが、これらの事実の解明にならないマウスの皮下移植実験を行って、その結果を無理やり解釈してもいたずらに混乱が生じるだけであり、このような実験は回避すべきである。

(参考文献)

- (1) Constance R. Chu et. al. : Tissue Engineering Part B ,16(1) : 105-115, 2010
- (2) Watrin-Pinzano, A. et. al. : Osteoarthritis Cartilage , 12(3): 191-200, 2004.
- (3) Wei, X et. al. : J Biomed Mater Res , 34(1): 63-72, 1997.
- (4) Shapiro et. al. : J Bone Joint Surg Am , 75(4): 532-553, 1993.
- (5) Jackson, D. W et. al. : J Bone Joint Surg Am ,83-A(1): 53-64, 2001
- (6) Niederauer et. al. : Biomaterials ,21 : 2561-2574, 2000
- (7) Strauss, E. J et. al. : Am J Sports Med, 33(11) : 1647-1653, 2005.
- (8) Brittberg et. al. :Clinical Orthopaedics and Related Research , 326 : 270-283, 1996
- (9) Breinan et.. al. : J. Bone Joint Surg Am , 79 :1439-51, 1997
- (10) Brehm et. al. : Osteoarthritis and Cartilage , 14 : 1214-1226, 2006
- (11) Yoshioka et. al. : Osteoarthritis and Cartilage , 4 : 87-98, 1996
- (12) Kikuchi et. al. : Osteoarthritis and Cartilage , 4 : 99-110, 1996
- (13) Driesang and Hunziker : Journal of Orthopaedic Research ,: Nov 909-911, 2000
- (14) Mankin et. al. : J Bone Joint Surg Am ,63 : 131-139,1981
- (15) Brittberg et. al. : ICRS Newsletter,1: 5-8, 1998
- (16) S.Wakitani et. al. : J Bone Joint Surg Am ,76: 579-592, 1994
- (17) Ostergaard K et.al.: ARTHRITIS & RHEUMATISM,40:1766-1771,1997
- (18) K.P.H. Pritzker et. al. :Osteoarthritis Cartilage , 14 : 13-29, 2006

臨床研究に関する報告

東京大学大学院医学系研究科 軟骨・骨再生医療寄附講座 星 和人
大阪保健医療大学 中村 憲正
東邦大学医学部 整形外科教室 勝呂 徹

1. 臨床研究に関連した本邦における指針
2. 本邦における再生医療臨床研究の実例
3. 臨床研究に関連した海外における指針
4. 海外における再生医療臨床研究の実例
5. 臨床研究デザインにおいて検討すべき項目

1. 臨床研究に関連した本邦における指針

臨床研究は、探索的臨床研究および検証的臨床研究に大別される。探索的臨床研究の目的は、安全性確立を目指した初期臨床導入であり、本邦においては自主臨床研究と呼称される。関連する指針・通知は、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針（平成18年7月3日厚生労働省）である。それに対して、検証的臨床研究は臨床上の有効性を実証を目的としており、医師主導あるいは企業主導治験がこれに該当する。関連する指針・通知としてはヒト（自己）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について(薬食発第 0208003 号平成 20 年 2 月 8 日)、ヒト（同種）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について(薬食発第 0912006 号平成 20 年 9 月 12 日)などが挙げられる。

ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針（平成18年7月3日厚生労働省）は、ヒト幹細胞臨床研究が社会の理解を得て、適正に実施・推進されるよう、個人の尊厳と人権を尊重し、かつ、科学的知見に基づいた有効性及び安全性を確保することを目的としている。そのため、幹細胞の調製方法や調製機関についての規定に重点がおかれている。臨床研究に関しては、「第1章 総則 第4 対象疾患等」に

「ヒト幹細胞臨床研究の対象は、次に掲げる要件に適合するものに限る。

- (1) 重篤で生命を脅かす疾患、身体の機能を著しく損なう疾患又は一定程度身体の機能若しくは形態を損なうことによりQOL（生活の質）を著しく損なう疾患であること。
- (2) ヒト幹細胞臨床研究による治療の効果が、現在可能な他の治療と比較して優れていると予測されるものであること。
- (3) 被験者にとってヒト幹細胞臨床研究の治療により得られる利益が、不利益を上回ると十分予測されるものであること。」

といった記載があるのみである。したがって、臨床研究の方法に関して詳細な言及はない。

ヒト（自己）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について(薬食発第 0208003 号平成 20 年 2 月 8 日)、ならびに、ヒト（同種）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保に（薬食発第 0912006 号平成 20 年 9 月 12 日）については、「第 7 章臨床試験」において、以下の記載がある。

「国内の治験計画について以下の項目を踏まえて評価すること。

- 1 対象疾患
- 2 対象とする被験者及び被験者から除外すべき患者の考え方
- 3 細胞・組織加工医薬品等の適用を含め、被験者に対して行われる治療内容
- 4 既存の治療法との比較を踏まえた臨床試験実施の妥当性
- 5 現在得られている情報から想定されるリスク及びベネフィットを含め、被験者への説明事項の案

なお、臨床試験は、適切な試験デザイン及びエンドポイントを設定して実施する必要がある、目的とする細胞・組織の由来、対象疾患及び適用方法等を踏まえて適切に計画すること。」

さらに、同指針に関わる Q&A（平成 20 年 3 月 12 日）において、「臨床試験は、当該細胞・組織加工医薬品等の目的とする細胞の由来、適用方法、対象疾患、対象疾患に対する既存の治療法等を踏まえて適切にデザインする必要があるが、必ずしも比較臨床試験でなければならないというものではない。例えば、自己細胞・組織を採取部位と同じ部位に、異所的でなく、適用する場合で、評価指標が明らかであるような場合には、必ずしも比較臨床試験を実施する必要はない場合もある。」とある。

このように、現行の厚労省指針・通知では、探索的・検証的臨床研究のいずれにおいても対照比較研究を必須とするものではない。しかし、その評価においては、historical control あるいは既存報告を参考にし比較・評価する必要はあると思われる。今後、世界戦略を考慮すべき製品に関しては、検証的臨床研究で無作為化を検討すべきであろう。評価においても盲検化を行うべきであろう。

2. 本邦における再生医療臨床研究の実例

自家培養表皮ジェイス（株式会社 ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング）の臨床試験を平成 19 年 10 月 3 日薬事・食品衛生審議会薬事分科会議事録 (<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2007/10/txt/s1003-4.txt>) に基づき調査した。

1) 臨床試験デザイン

多施設非盲検非対照試験

2) 対象疾患

自家植皮のための患皮面積が確保できない重篤な広範囲熱傷で、かつ受傷面積として深達性 II 度熱傷及び III 度熱傷創の合計面積が体表面積の 30%以上という重篤な熱傷

3) 登録症例数

2 例

4) 評価項目 (エンドポイント)

有効性：移植後 4 週間の表皮形成率

安全性：有害事象

3. 臨床研究に関連した海外における指針

米国においては、FDA より Guidance for Industry, Preparation of IDEs and INDs for products intended to repair or replace knee cartilage が 2007 年 7 月にドラフトとして開示された。正式発行ではなく、あくまでもガイドラインであり、法的な拘束力は持たない。(IDE, investigational device exemption; IND, investigational new drug)

以下のような指針が記載されている。

1) 臨床研究デザイン (探索的臨床研究/検証的臨床研究)

1. 探索的臨床研究

安全性データの取得

手術手技に関するデータの取得

生理活性データの取得

患者選択の妥当性の評価

用量の評価

などが目的。結果の解釈を最適化するために対照群をおくこと

2. 検証的臨床研究

有効性および安全性の検証

などが目的。

いずれも、Randomized Controlled Design で行うこと。可能性であれば RCD は盲検での実施を推奨。

2) 対象患者の選択

痛みの程度

変形性関節症の有無

身体機能

関節損傷の部位

損傷の深さ

損傷の面積

合併する関節病変 (例：半月板損傷、靭帯断裂など)

損傷に対する治療歴

などを勘案し決めるべきである。

対照群：historical control ではなく、concurrent control 1 をおくべきである。

軟骨や骨の損傷や深さや大きさ、広がり等を同等にした試験群で無作為比較対照試験（RCT）を推奨する。

3) 臨床研究におけるエンドポイント

1次エンドポイント：痛みや身体機能とすべき

—Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score(KOOS)

—IKDC Subjective Knee Evaluation Forum 2000

—Cincinnati Knee Rating Form

—Western Ontario and McMaster Universities Index(WOMAC)

2次エンドポイント：処置前後の軟骨損傷の大きさ、部位、関節鏡評価のグレード

—国際軟骨修復学会(International Cartilage Repair Society, ICRS) score

4) 手術手技と術後のリハビリテーション

—麻酔、皮切、術中疼痛処置

—荷重負担の接続時間、方法、頻度

—用いた鎮痛剤の種類、用量、頻度

—リハビリテーションの種類、頻度

5) 経過観察期間

非臨床試験と適応疾患の経過に基づいて決定されるべき。

2年間の安全性フォローアップが推奨される（探索的臨床研究の開始から起算）。

非吸収性素材を含有する場合は、5年間の安全性フォローアップが推奨される。

欧州 EMEA では、Guideline on human cell-based medical products

「ヒト細胞由来製剤に関するガイドライン」(EMA/CHMP/410869/2006, 11 Jan 2007)、および Reflection paper on IN-VITRO CULTURED CHONDROCYTE CONTAINING PRODUCTS FOR CARTILAGE REPAIR OF THE KNEE「省察書 膝軟骨修復用製剤を含有するインビトロ培養軟骨細胞について」(EMA/CAT/CPWP/288934/2009, 17 Sep 2009)、の2つが参考資料として挙げられる。

「省察書 膝軟骨修復用製剤を含有するインビトロ培養軟骨細胞について」(EMA/CAT/CPWP/288934/2009) (2009年9月17日) が以下の指針を示しており、特に参考になると思われる。

1) 臨床研究デザイン (探索的臨床研究/検証的臨床研究)

1. 探索的臨床研究

安全性のデータ取得

用量の評価

手術手技に対する評価

検証的研究の設計に対する情報提供

並行群を用いる無作為化対照研究が推奨される。

2. 検証的臨床研究

有効性の検証

前向き無作為化、非盲検、盲検化評価が推奨される。

2) 対象患者の選択

症状

機能性

局在性

膝欠損部の大きさや深さ

併存する関節病変

欠損部の治療歴

など、関連する基準に応じて選定すべきである。

対照群：

病変が 4 cm² 未満の患者の場合、現在採用されている合理的な外科的比較療法 (マイクロフラクチャーなど) が、合理的選択肢である。

病変が 4 cm² 以上の患者の場合、標準的な療法の有効性がまだ明確でないため、最善の治療基準が、合理的選択肢である。

3) 臨床研究におけるエンドポイント

1次エンドポイント： 患者ベースの機能、痛み評価

Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score(KOOS)

International Knee Documentation Committee (IKDC) score

Western Ontario and McMaster Universities Index(WOMAC)

Lysholm score

2次エンドポイント： 構造的改善

盲検化標準MRI

膝身体所見

関節鏡評価

国際軟骨修復学会 ICRS スコア（関節鏡、組織）

X線評価

4) 経過観察期間

探索的臨床研究： 臨床的エンドポイント2年以上、構造的エンドポイント1年以上、非臨床試験と適応疾患の経過に基づいて決定されるべき。

検証的臨床研究： 臨床有効性を評価するために3年間のフォローアップが必要である。

4. 海外における再生医療臨床研究の実例

ChondroCelect (TiGenix 社, ベルギー) に関する第 III 相多施設無作為化対照試験 (TIG/ACT/01/2000 および TIG/ACI/01/2000EXT) が海外実例として挙げられる。

1) 臨床研究デザイン

多施設無作為化対照試験 (評価の盲検化)

なお、用量反応研究は行っていない。用量は、TiGenix 社が実施した動物試験、既刊の文献、ヒトの ACI 処置における経験を基に、総合的に判断した。

2) 対象疾患

大腿頭に 1-5 cm² の範囲で単一の症候性軟骨病変を生じた、18 歳から 50 歳までの患者。

膝蓋大腿軟骨病変患者、離断性骨軟骨症 (OCD) 患者、病変深度が 0.5 cm を超える患者、最近 12 ヶ月以内に半月板移植、骨軟骨移植術、あるいはマイクロフラクチャーを受けた患者は除外された。

患者は、厳格なリハビリテーションプロトコール及びフォローアッププログラムへの積極参加への同意を義務付けられた。

3) 登録症例数

118 例 (ChondroCelect 群 57 例、Microfracture 群 61 例)

4) 評価項目 (エンドポイント)

1 次エンドポイント：おもに臨床エンドポイント

Microfracture と比較した、KOOS による

1. 痛み
2. その他、腫脹、動作範囲の制限、機械的制限などの症状
3. 日常生活での機能
4. スポーツやレクリエーションでの機能

5. 膝関連の生活の質の非劣性を実証

2次エンドポイント：おもに構造修復エンドポイント

ICRS II の下位尺度

MRI 測定結果

ICRS の視覚的組織学的評価スコア。

サフラニン O 染色及びコラーゲン II 染色に関する組織形態学的スコア

総体的組織学評価スコア

5) 試験期間

臨床エンドポイント：移植後 12-18 ヶ月

構造修復エンドポイント：移植後 12 ヶ月

5. 臨床研究デザインにおいて検討すべき項目

したがって、臨床研究デザインにおいて検討すべき項目としては、

臨床研究デザイン対照群の設定

盲検化、無作為化について

症例数

適正な症例数の決定方法

探索的臨床研究における検討項目

安全性や用量反応性について

検証的臨床研究における評価項目（エンドポイント）

有効性について

1次/2次エンドポイント

試験期間

1次/2次エンドポイントに対しての評価期間

といったものを検討する必要がある。

臨床研究デザインについては、現行の厚労省指針・通知では、探索的/検証的臨床研究のいずれにおいても対照比較研究を必須とするものではない。しかし、その評価においては、**historical control** あるいは既存報告を参考にし比較・評価する必要があると思われる。今後、世界戦略を考慮すべき製品に関しては、検証的臨床研究で無作為化を検討すべきであろう。評価においても盲検化を行うべきであろう。

症例数は前臨床研究での成績などを考慮し、科学的な根拠を持って決めるのが妥当と思われる。探索的臨床研究における検討項目として挙げられる用量反応性は、臨床研究で症例数を確保する

のが困難である実状を考えると、前臨床研究で評価するのが妥当的はないか。

検証的臨床研究における評価項目（エンドポイント）は、1次エンドポイントとして患者の症状や機能を反映する臨床エンドポイントをもちいることが推奨される。過去の実例では、対照方法と比較して非劣性を証明することをもって有効とする場合もあった。2次エンドポイントは画像情報などから得られる構造修復エンドポイントが推奨される。構造修復エンドポイントについては、前臨床試験と共通の方法で評価する項目が含まれることが望まれる。

試験期間は、製品の性質や臨床上の目標などを勘案し、適切な期間を選定すべきである。