

平成18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

京都大学医学部心臓血管外科

米田 正始

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18年度WG会議議事概要

III. 本文

1. 評価指標作成に向けて

1-1. 細胞シート製造過程について

大阪大学医学部附属病院 未来医療センター 菺田 弘

1-2. 細胞シート製造過程について

大阪大学医学部附属病院 未来医療センター 菺田 弘

1-3. 臨床段階（移植後、有効性など）について

国立循環器病センター研究所 再生医療部 永谷憲歳

2. 調査事項

2-1. 再生医療における不整脈モデル

慶應義塾大学医学部 心臓病先進治療学講座 三好俊一郎

2-2. ヒト化マウスを用いた再生医療実現のためのトランスレーショナルリサーチ

理化学研究所 横浜研究所 免疫アレルギー科学総合研究センター
ヒト疾患モデル研究ユニット 石川文彦

2-3. アロ移植の現状および組織適合性評価試験について

大阪大学医学部附属病院 未来医療センター 菺田 弘

2-4. 細胞ソースとしての間葉系幹細胞

2-4-1. 間葉系幹細胞の同定（1）

広島大学大学院医歯薬学総合研究科（口腔生化学） 加藤幸夫

2-4-2. 間葉系幹細胞の同定（2）

国立成育医療センター研究所 生殖医療研究部 梅澤明弘

2-4-3. 間葉系幹細胞の同定（3）

国立循環器病センター研究所 再生医療部 永谷憲歳

2-5. 骨格筋芽細胞移植による心臓再生の現状と機序

大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管・呼吸器外科 澤 芳樹

2-6. 再生医療とサイトカイン

2-6-1. FGF (Fibroblast growth factor)

京都大学大学院医学研究科 心臓血管外科 米田正始

2-6-2. インスリン様増殖因子 (IGF-1) と骨髄間葉系幹細胞併用による心血管再生療法の可能性

国立循環器病センター研究所 再生医療部 永谷憲歳

2-6-3. HGF を基盤とした再生医療の現状と展望

大阪大学大学院医学系研究科 臨床遺伝子治療学 森下竜一

2-6-4. VEGF による血管新生促進療法

東海大学医学部再生医療科学 先端医療センター研究所 浅原孝之

2-6-5. アンジオポエチンと血管新生

名古屋大学大学院医学系研究科 室原豊明

2-7. 再生医療製品における血清の安全使用

東京大学医科学研究所細胞プロセッシング

CERES 寄付研究部門 高橋恒夫

2-8. 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

東京理科大学基礎工学部 材料工学科 菊池明彦

IV. 参考資料

1-1. 心筋の機能におけるギャップ結合機能評価の重要性について

国立医薬品食品衛生研究所 療品部 土屋利江

1-2. 軟寒天コロニー形成試験法およびヌードマウス移植腫瘍性試験について

国立医薬品食品衛生研究所 療品部 土屋利江

1-3. オーストラリアにおける medical device の Regulation について

東京歯科大学市川総合病院 篠崎尚史

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

米田正始 京都大学 医学部 心臓血管外科 教授

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 助教授

菰田 弘 大阪大学 医学部付属病院未来医療センター 特任研究員

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

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

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

高江慎一 厚生労働省 医療機器審査管理室 新医療材料専門官

武田淳仁 厚生労働省 医療機器審査管理室 厚生労働技官

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構

田中克平 医薬品医療機器総合機構 生物系審査部 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 研究官

II. 平成 18 年度 WG 会議議事概要

次世代医療機器評価指標作成検討会 再生医療審査 WG 第一回委員会議事録（概要）

1. 開催日時 2006 年 7 月 4 日 14:00～16:00

2. 開催場所 オフィス東京 2F A 会議室

3. 出席者（敬称略・五十音順）

委員：米田正始（京都大学）、菰田弘（大阪大学）、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）

厚生労働省：高岡志帆（健康局疾病対策課臓器移植対策室）

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

4. 配付資料

資料 1. 平成 18 年度第一回委員会議事次第

資料 2. 平成 17 年度第三回委員会議事概要

資料 3. 平成 17 年度第三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

資料 4. 合同検討会用資料（再生医療 WG）

5. 議事内容

①座長より開会挨拶 米田座長（京都大学）

②平成 18 年度の委員が事務局より紹介された。委員は下記の通り。（敬称略）

慶應義塾大学 医学部 生理学教室教授 岡野栄之

東京歯科大学 市川総合病院角膜センター センター長 篠崎尚史

国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 再生医療部部長 永谷憲歳

東京理科大学 基礎工学部 材料工学科 助教授 菊池明彦

大阪大学 医学部付属病院未来医療センター 特任研究員 菰田 弘

③平成 17 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。

④平成 17 年度 第三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。

⑤平成 18 年度の活動計画について

平成 18 年度の活動としては、平成 17 年度に引き続き下記の内容について調査を行うこととし、委員をはじめ国内外の専門家に依頼し、報告書としてまとめることで合意した。

- ・ 不整脈モデルについて
- ・ 拒絶反応モデル(allo)について—ヒト化マウス—
- ・ 間葉系幹細胞の同定(由来の違いについて)*
 - 骨髄由来単核球細胞
 - 前駆細胞
 - 骨髄由来間葉系幹細胞
 - 脂肪由来間葉系幹細胞
 - 心筋由来間葉系幹細胞
- ・ 骨格筋芽細胞*
- ・ 血清の問題について
- ・ 基材開発としての多孔性膜への温度応答機能の導入について

*両細胞ともサイトカインについても論じる。

- 自ら出すサイトカイン
- 併用治療としてのサイトカイン

— VEGF
— HGF
— FGF
— IGF
— PDGF
— angiopoietin

上記内容については、全て 1. with/without sheet、2. 動物+ヒトのデータについて論じることとする。

各委員の担当調査項目について決定し、さらに各項目について調査依頼を行う国内外の専門家を列挙した。また、本委員会時間内では適任者を挙げることの出来なかった項目については、後ほど各委員及び事務局で適任者を探索することとした。

⑥今後の会議日程について

第二回委員会を 9 月または 10 月に、第三回委員会を 11 月または 12 月に開催する予定であり、早いうちに日程調整を行う旨を事務局より報告された。

次世代医療機器評価指標作成検討会
再生医療審査 WG 第二回委員会議事録（概要）

1. 開催日時 2006年10月18日 10:00～12:00

2. 開催場所 オフィス東京 2F C 会議室

3. 出席者（敬称略・五十音順）

委員：菊池明彦（東京理科大学）、菰田弘（大阪大学）、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）

厚生労働省：武田淳仁、俵木登美子（医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室）

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

4. 配付資料

資料 1. 平成 18 年度第二回委員会議事次第

資料 2. 平成 18 年度第一回委員会議事概要

資料 3. 平成 18 年度報告書執筆依頼状況

資料 4. 平成 17 年度報告書への提言

資料 5. 平成 17 年度報告書（抜粋）及び Web 公開用修正版（IV-3-1.）

5. 議事内容

①平成 18 年度第一回委員会会議議事概要について、事務局より報告があった。

②平成 18 年度の活動の一環である研究調査について、現段階での各専門家への依頼状況が事務局より説明された。第一回委員会の際に決定した研究調査内容に加えて、新たに「アロ移植の現状および組織適合性評価試験について（菰田委員担当）」が追加された。また、現段階で調査担当の決定していない項目のうち「骨格筋芽細胞（基礎分野）」は大阪大学教授澤芳樹先生にお願いすることとした。また、「PDGF」及び「Angiopoietin」については、米田座長より候補者の推薦を頂くことにした。さらに海外情報（オーストラリアの例など）について、篠崎委員による資料提供がなされることになった。

③審査 WG と開発 WG の位置づけについて、両者の住み分けを明確にすべきであるとの意見が出た。本来は開発 WG で取り上げた内容（新規の開発品）を受けて審査 WG が検討するべきであろう。審査 WG としては「リスク&ベネフィット」の理論を念頭に、有効性を明確にした上で安全性に対して厳しい評価をしていくべきであるとの意見が出た。

④平成17年度報告書の以下の内容について提言があり、平成 17 年度報告書内容について再検討された。

IV-3-2 細胞シート製造過程について

1. 細胞シートに残存しうる処理工程由来物質の評価の項について
2. 細胞シート製造過程における細胞機能評価の項について
3. 細胞シート製造にかかる原物質・中間産物の保存の項について
4. 細胞シートの機能評価基準の項について
5. 細胞シートにかかる動物実験に関する指針の項における腫瘍源性について

IV-3-3 臨床段階(移植後、有効性など)について

1. 「ヒト幹細胞を用いた臨床研究は基本的に厚生労働省ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針に従って行われるべきであるが・・・」の表現について
2. 使用する VAS について
3. 不整脈に関する前臨床試験の項目について

以上について再検討した内容を踏まえ、昨年度の報告書を見直して改訂を行い、今年度の報告書の中に入れ、公開していくことで合意した。

⑤細胞ソースを以下の観点から分けて論ずるべきとの指摘があった。

・Allo { single donor
 { multiple donor

・Auto

⑥今後の会議日程について、以下の通り事務局より報告があった。

平成 18 年度第三回委員会

平成 18 年 12 月 13 日 (水) 午後 2 時～4 時 於：オフィス東京

次世代医療機器評価指標作成検討会
再生医療審査 WG 第三回委員会議事録（概要）

1. 開催日時 2006年12月13日 14:00～16:00

2. 開催場所 オフィス東京 2F C会議室

3. 出席者（敬称略）

委員：米田正始（京都大学）、岡野栄之（慶応義塾大学）、菊池明彦（東京理科大学）、
菰田弘（大阪大学）、大西俊介（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）：高江慎一、武田淳仁
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：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. 配付資料

資料 1. 平成 18 年度第三回委員会議事次第

資料 2. 平成 18 年度第二回委員会議事概要

資料 3. 平成 18 年度第二回合同検討会資料

資料 4. 医薬発第 1314 号：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

資料 5. 平成 17 年度報告書（IV-3-1. 菊池委員担当分）

資料 6. 平成 17 年度報告書（IV-3-2. 修正版 松山委員担当分）

資料 7. 平成 17 年度報告書（IV-3-3. 修正版 永谷委員担当分）

資料 8. 「医薬発第 1314 号」v.s. 「平成 17 年度報告書」照らし合わせ作業シート

資料 9. 社団法人関西経済連合会による「提言」

資料 10. 平成 18 年度報告書 菰田委員担当分

資料 11. 冠動脈ステントの承認申請に係る取扱いについて

5. 議事内容

①平成 18 年度第二回委員会会議議事概要について、事務局より報告があった。

②平成 18 年度第二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）合同検討会の報告として、合同検討
会における再生医療審査 WG の発表内容について審査 WG 事務局より、また再生
医療開発 WG の発表内容について開発 WG 事務局より報告された。さらに、次世代

医療機器評価指標検討会事業の今後の進め方について合同検討会事務局である厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室より説明された。

③新委員として、(独)医薬品医療機器総合機構生物系審査部長田中克平氏が加わることが報告された。

④平成 17 年度報告書の松山委員担当部分 (IV-3-2.) に対して本 WG 前委員会で指摘があった点について修正された文書 (資料 6) の内容について討議された。修正により削除された部分の中に内容的に重要と思われる点が含まれているとの指摘があり、再度調整をお願いすることとなった。

⑤平成 17 年度報告書内容と「医薬発第 1314 号一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」との照らし合わせ作業を行った。作業に先立ち、本 WG が今年度目指す「指針の素案」作りにあたって、平成 12 年に通知としてすでに出されている医薬発第 1314 号の別添 2「ヒト由来細胞・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」を基礎とした上で「細胞シート」に特化した項目を加えることによって「指針の素案」作りが効率的に行うことができるのではないかとの提案により上記作業を行うことになった経緯についての説明がなされた。その後、実際に作業を進めた所、医薬発第 1314 号がすでに 6 年前に出されている点からも使用されている用語等から見直す必要があるとの指摘があった (例：厚生省→厚生労働省)。そこで、本 WG が今年度目指す「指針の素案」作りにあたって、以下の点についての作業を行うこととなった。

1. 「医薬発 1314 号」の別添 2 において、抜けているまたは「細胞シート」用に新規に作成する文書上では表現を変更した方が良いと思われる点の列挙
例：抗生物質、定義、感染症評価中の表現 (痴呆症など)
2. 新規の用語の定義の設定
例：「組織工学的処置」とは、「シート化」とは
3. 「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」との照らし合わせ
4. 昨年度松山委員担当分と永谷委員担当分の内容を中心とする
5. 昨年度菊池委員担当分の内容を、細胞を培養する場合に温度応答性培養皿を用いる際の参考資料とする

Ⅲ. 本文

1. 評価指標作成に向けて

1-1. 細胞シート製造過程について

大阪大学医学部附属病院 未来医療センター 菰田 弘

1-2. 細胞シート製造過程について

大阪大学医学部附属病院 未来医療センター 菰田 弘

1-3. 臨床段階（移植後、有効性など）について

国立循環器病センター研究所 再生医療部 永谷憲歳

Ⅲ-1-1. 細胞シート製造過程について

大阪大学医学部付属病院未来医療センター 菺田 弘

製本標準書など添付文書

審査に当たっては、製造責任者・品質管理者・製造管理者が明示された細胞シート作成に関する製品標準書が添付され、かつ細胞シート製造に関する標準手順書・製造指図書が項目ごとに一覧として添付されねばならない。また、製品標準書には、以下に記載される項目につき不足なく記載されている必要がある。なお、細胞・組織採取より製造、次いで治療使用にいたる過程に関し可及的に図表などを用いた細胞シート作成のフローチャートを示すことが望ましい。

細胞シート製造にかかる原物質（細胞・組織）の採取医療機関

細胞シート製造にかかる細胞・組織については、細胞・組織の採取および保存に必要な衛生上の管理がなされており、採取に関して十分な知識、技術を持つ人員を有しているか、あるいは同等以上の要件を満たす医療機関等で採取されなければならない。

細胞シート製造にかかる原物質（細胞・組織）の由来

血液学的評価

細胞・組織を採取した個体の血液型（ABO型とRh型）ならびに不規則抗体の有無

感染症評価

以下の項目に関しては問診および検査（血清学的検査あるいは核酸増幅法など）により評価されなければならない。

- (a) CMV抗体 (IgG と IgM)
- (b) B型およびC型肝炎の感染状況 (HbsAg、抗 HCV抗体)
- (c) HIV抗体 (anti HIV 1 と 2)
- (d) HTLV 1 と 2抗体
- (e) ヘルペス水痘と帯状疱疹
- (f) EBウイルス抗体
- (g) パルボウイルス B19 感染症
- (h) トキソプラズマ症抗体
- (i) 梅毒トレポネーマ (RPHA または VDRL)
- (j) クラミジア
- (k) 淋菌

(1) 結核菌

なお、B 型肝炎、クラミジア、淋菌、結核菌あるいは梅毒の感染に関しては、既感染治癒の場合利用可とする。

医薬発第 1314 号によれば、自己細胞を用いる場合には特定生物由来材料ではないため、上記の感染症評価は不要とされているが、確認されることが望ましい。

細胞シート製造にかかる原物質（細胞・組織）の採取部位

目的とする細胞・組織を採取するのにもっとも安全に採取できる部位を選択し記載されるものとする。なお、採取部位選択にあたっては個々の提供者の事情を十二分に勘案し、安全性を最優先とするものとする。

細胞シート製造にかかる原物質（細胞・組織）の採取工程管理

細胞シート製造にかかる最初の工程である採取工程は、一連の再生医療機器の臨床に關与する主治医団の医師が担当するものとし、その責任者は明示されなければならない。当該臨床責任者とは、製品標準書に記載された製造責任者であることが望ましい。採取工程は標準手順書に明示された手法によることとし、当該手順書には細胞・組織採取部位、麻酔法、採取手順が記載される必要があり、またこれら工程が手順書通りに運用されたことを保証されなければならない。

細胞・組織の採取に当たっては、採取の過程における微生物等の汚染を防ぐために必要な措置を講じること。すなわち、細胞、組織を採取する場所は手術室あるいはそれに準じる水準で衛生上の管理が行われなければならない。また、必要に応じて、採取された細胞・組織に対して細菌、真菌、ウイルス等の汚染に関する適切な検査を行い、採取時の微生物汚染、細菌、真菌、ウイルス等の存在を否定すること。

採取された細胞・組織は速やかに無菌的細胞調整施設に搬送され、分離など処理段階に進められねばならない。搬送容器、搬送条件は明記される必要がある。なお、採取場所と無菌的細胞調整施設とが同一施設内に存在しない場合など速やかに処理に進められない場合は、それによる細胞などの品質が低下しないことをあらかじめ評価しなければならない。

細胞シート製造施設

細胞シート製造を行いうる施設は、医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（平成 9 年構成省令第 28 号）第 17 条第 1 項の希求する水準に達していなければならない。すなわち、細胞シートの製造・取り扱いに関して施設内に専用の無菌的細胞調製施設を有しており、その validation が定期的に行われてい

ること、すなわち GMP 準拠施設であることが求められる。また、採取された細胞・組織の製造および保存に必要な衛生上の管理がなされており、製造に関して十分な知識、技術を持つ人員を有していることが求められる。製造作業の開始前に、製造従事者に対して教育訓練ならびに健康診断を行い、また定期的に教育訓練および健康診断を行われていなければならない。

採取した細胞・組織の保存

保存にかかる標準手順書が用意され、また保存による生理活性の低下に関する評価、生存率の低下、融解後培養工程における細胞の質的評価が必要である。これら評価は、あらかじめ行われるか、あるいは文献的に設定根拠を明示されなければならない。たとえば、骨格筋由来筋芽細胞シートの製造においては、大腿より骨格筋を採取するわけであるが、その一部を凍結することも可能である。

細胞シート製造にかかる原物質・中間産物の包装・輸送

細胞シート製造にかかる原物質・中間産物あるいは最終製品の輸送に関しては、その輸送による品質に低下をさけるため、輸送時間・状況による品質に関する管理指標を明確とした標準手順書が作成されなければならない。また、輸送において輸送容器・輸送時の温度管理・時間管理の手順が明確であることが必要である。

細胞シート製造にかかる原物質・中間産物の処理工程管理

採取法、処理法、培養法、保存法のすべてにおいて、標準手順書が作成されている必要がある。それら各々の段階における細胞の回収率、生存率に加え、当該段階にて得られるべき細胞種を評価するに値する表面抗原あるいは mRNA の発現ないしは蛋白の発現を検討することが望ましい。

細胞の回収率

回収方法は標準手順書に記載された通りに行われなければならない。これは、回収率を評価予測することで、最終製品に必要な細胞数を十分に確保することが可能となるからである。

細胞の生存率

細胞シート製造における処理培養段階のうち、製品標準書に記載された段階において細胞の生存率が測定されなければならない。生存率が測定される段階とは、培養細胞を単離分取する過程のこととし、特に細胞をシートに移植する

時点での生存率に測定記載は不可欠である。生存率の測定法に関してはあらかじめ手順書にて明示される必要がある。

細胞シート製造にかかる原物質・中間産物の処理工程に用いる試薬・製剤・薬剤

細胞シート製造工程にて使用される試薬・製剤・薬剤はすべて GLP 水準以上、のぞむべくは GMP 準拠ないしは薬事法に基づき医薬品として認可されたものを用いるものとする。それらはロットごとにその評価がなされ、かつロットごとの製造者による GLP ないしは GMP 準拠である旨記載された保証書が製造責任者に保管され、その一覧の添付が審査にあたり義務付けられる。院内製剤などで GLP 準拠など明示ができない製剤を製造過程にて用いる場合は、その validation を別途心筋シート製造者の責任において行わなければならない。validation 法に関しては、日本薬局方に基づき無菌検査、マイコプラズマ検査、エンドトキシン検査を行い、いずれも医療機器としての基準を満たすことが必要である。また、活性物質である場合はその活性評価を行い、ロットごとに保証されねばならない。

細胞シートに残存しうる異種由来物質の評価

再生医療機器において、とくに頻回投与されうる製品に関しては、免疫原性を有するものを避けることが望ましい。

細胞シートに残存しうる処理工程由来物質の評価

支持体あるいは培養皿など細胞に接した、あるいは接する化学合成物が、細胞シートにおいて残存することは極力さげねばならない。

細胞シートに用いる原物質・中間産物の無菌検査

細胞シートの感染性評価は、日本薬局方に準拠し無菌検査、マイコプラズマ汚染試験、およびエンドトキシン検査を行わなければならない。これらは、細胞培養の各過程あるいは最終培養時の培養廃液あるいは最終製品により行われるように規定する。また、1ヶ月を超える長期培養の場合、1ヶ月を超えない間隔でこれら評価を行わなければならない。

無菌検査はメンブレンフィルター法ないしは培地法で行わなければならない。

マイコプラズマ汚染試験は、マイコプラズマが細胞内寄生生物であることから、細胞が懸濁した溶液で行われなければならない。最終培養廃液あるいは細胞保存液にて代用できるものとするが、この場合は、試験を施行した検体を明示するべきである。

エンドトキシン検査に関しては、未使用細胞培養液にて検査の後に陰性を確認された後に使用を可能としたことが明記されていなければならない。これは、最終製品の洗浄液よりエンドトキシンが検出感度以下であるなら、当該製品はエンドトキシンに汚染されていないものとみなし、生体投与可能な細胞シートとして認める。最終製品の洗浄液にエンドトキシンが検出された場合は、同一ロットの製品エンドトキシン混入量を直接測定し、製品が生体投与されたのち、薬事法の規定するエンドトキシン投与可能量以下であることを確認のうえ移植可能とする。なお、細胞シート移植によるエンドトキシン注入時間は便宜的に1時間と設定する。

細胞シート製造過程における細胞機能評価

細胞シート製造にあたり、その素材としての筋芽細胞などの質・量の評価がなされ、採取細胞・組織の量より推定される範囲にその評価値が入ることを確認されねばならない。細胞の質に関しては、培養された細胞が細胞シートを製造するにたる機能を有しているかが評価項目となる。すなわち、得られた主要細胞種の同定、その純度、また混在する目的としていない細胞集団、また細胞の増殖度である。純度検定に用いる蛍光標識抗表面抗原抗体は、細胞種によりあらかじめ蛍光標識抗表面抗原抗体は規定するものとする。骨格筋由来細胞を用いた細胞シートの場合、一例としてCD56とする。混在する目的としていない細胞に関しては、その混在比率を評価するとともに、その混在により目的としている細胞の機能低下の有無をあらかじめ評価しなければならない。

細胞シート製造にかかる原物質・中間産物の保存

原物質あるいは中間産物の保存に関しては、保存にかかる手順の明確化、保存に関連する薬剤・器材の validation が行われるべきである。また、保存により製品基準書に定義された生存率、細胞活性などを下回っていないことの評価があらかじめ行われなければならない。また、保存期間の上限をこえてしまった原物質・中間産物の処理法を明記する必要がある。細胞の保存に関してはあらかじめ保存法を設定することとする。

細胞シートの機能評価基準（これらについては開発ガイドラインを参考として作成）

細胞シートの形状評価

細胞シートの面積設定

細胞シートの厚さの設定（細胞シートの層数）（設定根拠：血管新生する場合としない場合で厚さの規定に差をつける）

細胞シートの均一性評価

構成細胞群の population 分布は、免疫組織学的検討にて行われることとする。
骨格筋由来細胞を用いた細胞シートにおいては CD56 による免疫組織化学的検討
を行うべきである。

Ⅲ-1-2. 細胞シートにかかる動物実験に関する指針

大阪大学医学部付属病院未来医療センター 菰田 弘

目的

細胞シートにかかる動物への移植実験の目的は、その臨床使用に向けた安全性ならびに有効性の担保である。

安全性検討項目

安全性に関する検討項目として、細胞シート移植にともなう腫瘍原性ならびに催不整脈性は検討されなければならない。但し、評価に関してはモデル動物の寿命という観点から、短期的安全性に関しては評価できていても、長期的安全性は担保されていないことを認識するべきである。

(1) 腫瘍原性に関する検討

細胞シート移植に伴う腫瘍原性については、ヌードマウスあるいは NOD/SCID マウスにヒト由来細胞を用いた細胞シートを移植し腫瘍発生の有無を確認する。これは、心臓の原発性腫瘍は極めて稀であるとされるが細胞シートが移植されることで心臓へ腫瘍になり得るような血管内皮など増殖能を有する細胞の浸潤の可能も否定できないが故である。移植部位に関しては、心筋梗塞あるいは拡張型心筋症モデル作成により障害をうけた心筋表面への移植により検討されることが望ましいが、皮下移植でも代用可能とする。なお、観察期間は 3 ヶ月とする。

(2) 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ことを十分認識した上で、犬あるいは豚ないしこれに準じた中大動物にて検討を行うものとする。細胞シート移植のためにモデル動物作成は、冠動脈結さつによる心筋梗塞モデルによるか、あるいは overdriving 法による拡張型心筋症モデルのいずれかによる。いずれを選択するかは、細胞シートの治療対象に合致するものを選択するものとする。

モデル動物における Holter 心電図と移植後における心電図を比較して有意に生命に危機を及ぼしうる不整脈が出現あるいは増加しているか否かを検討する。

有効性検討項目

有効性に関する検討項目として少なくとも以下の項目が評価されなければならない。但し、評価に関してはモデル動物の寿命という観点から、短期的な有

効性に関しては評価しえても、長期的な有効性に関しては不明であることを認識すべきである。

モデル動物作成は、冠動脈結さつによる心筋梗塞モデルによるかあるいは overdriving 法による拡張型心筋症モデルのいずれかによるが、いずれのモデルを選択するかは細胞シートの移植対象疾患に近似しうるものとする。

(1) 機能評価

細胞シート移植による機能評価は、細胞シート移植部位のみならず、心全体で評価されるべきである。評価は収縮能・拡張能にて行うものとし、評価手段はカラーメトリーを併用した心臓超音波検査、あるいは造影 MRI などいずれでもよい。

(2) 血管新生の評価および細胞シート内細胞の生存確認

細胞シート移植後における血流の増加あるいは維持をもって血管新生の評価ならびにシート内細胞生存とする。評価手段としては FDG-PET にてよる検討あるいは造影剤を用いた心臓超音波検査によるが、科学的に評価に耐えうるものであればこの限りではない。

(3) 形態学的評価

組織学的検討として、モデル動物における移植後細胞シートに内包される細胞の生存数あるいは残存数、またシート厚および形状の変化の検討を行われるべきである。また、移植部位において細胞シートに接触している部位の線維変性および炎症細胞の浸潤の有無を確認するとともに、細胞シートを縫合しているなら、縫合部位の組織学的検討を行うべきである。また、移植後、細胞シート内の細胞が肥大化あるいは錯綜配列などにおちいていないかの検討も必要である。

(4) 血清学的検討

モデル動物における血清学的評価として、有効性の検討としては BNP を指標とする。また、安全性の評価としては腎機能、肝機能を評価するとともに、急性心筋障害の指標としては CKMB を、慢性心筋障害の指標としては一例として FABP などを評価するものとする。

Ⅲ-1-3. 臨床段階（移植後、有効性など）について

国立循環器病センター研究所再生医療部 永谷憲歳

細胞シートを用いる臨床試験（移植後、有効性など）において、考慮すべき以下の項目について検討を行った。今回は細胞シートの心血管病への応用に特に関係する事項について記載した。

第1章 被験者

第2章 安全性と有効性の評価

第3章 インフォームド・コンセント

第1章 被験者

1. 被験者の選定

総括責任者又は総括責任者の指示を受けた医師である研究者（以下、「総括責任者等」という）は、被験者の選定に当たり、人権保護の観点から、病状、年齢、同意能力等を考慮し、慎重に検討しなければならない。被験者の選定にあたっては、選択基準の全てを満たし、除外基準のいずれにも該当しない被験者を対象とする。被験者に対する再生医療臨床試験の適応に関する最終的な決定は、再生医療および心不全治療に対する高度の専門的知識を有する医師を含む委員会において行うべきである。

2. 対象疾患等

対象は次のすべての要件に適合するものに限る。

- 1) 既存の治療に抵抗性の心血管病であること。具体的には、陳旧性心筋梗塞、拡張型心筋症らによる慢性心不全や、先天性心疾患らにより機能が著しく障害された難治性心血管病、その他、既存の方法で治療不可能な心血管病。
- 2) 再生医療臨床試験による治療効果が、既存の治療方法と比較して優れていることが十分に予測されるものであること。
- 3) 被験者にとって細胞移植治療臨床試験により得られる利益が、不利益を上回ることが十分に予測されるものであること。

3. 選択基準：以下の基準を全て満たす症例を対象とする。

- 1) 既存の治療に抵抗性の心血管病であること。既存の治療とは薬物治療、経皮的バルーン冠血管形成術、冠動脈バイパス術、弁形成または置換術らを意味する。
- 2) 高齢者はなるべく避ける（患者の利益と不利益を考慮する）
- 3) 血行動態が安定した患者（急性増悪を起こしていない患者）
- 4) 3ヵ月以内のカテーテル検査で経皮的バルーン冠血管形成術、冠動脈バイパス術、弁形成または置換術らの適応が無いもの
- 5) 患者又は代諾者等により文書により同意を得られた患者

4. 除外基準：以下の基準に1つでも該当する症例は除外とする。

- 1) 悪性腫瘍を有する患者
- 2) 活動性の感染症を有する患者
- 3) 増殖糖尿病網膜症（未治療の増殖網膜症、中期・晩期増殖網膜症）を有する患者（治療終了例は除く）
- 4) 腎機能不全、肝機能不全症を有する患者
- 5) 経皮的バルーン冠血管形成術、冠動脈バイパス術、弁形成または置換術らが同意日6ヶ月以内に施行された患者
- 6) 同意日6ヶ月以内に急性心筋梗塞、不安定狭心症、心筋炎らに罹患した患者
- 7) 妊婦または妊娠している可能性のある患者
- 8) その他、担当医師が不相当と判断した患者

5. 医療機器との併用の必要性の有無・注意すべき点

- 1) 重症心不全に対する細胞シートを用いた再生治療の臨床応用に際しては、患者の全身状態が安定している時期に施行すべきである。低心機能により循環動態の維持が困難となり機械的補助が必要な患者を対象とする場合、原則1ヶ月以上の長期補助が可能な補助循環装置を選択すべきである。
- 2) 大動脈バルーンポンピング；intra-aortic balloon pumping(IABP)、経皮的心肺補助法；percutaneous cardiopulmonary support(PCPS)など長期使用が困難な機械的補助下にある患者は対象とすべきでない。一方補助人工心臓；ventricular assist system(VAS)を装着後、全身状態が安定した

患者は良い適応となるであろう。

- 3) VAS と細胞シートを用いた再生医療を併用し VAS 離脱を目指す場合、開胸手技を繰り返すことに伴う侵襲を最小限にするには、①予め心筋生検病理診断から再生医療による回復がどの程度期待出来るかを検討し VAS 装着時に細胞シート移植を併用するか、②自己心機能が少量カテコラミン投与下に VAS 離脱が可能な程度まで回復していると判断したら離脱時に細胞シートを移植する、ことが望ましい。②の場合、自己細胞採取は VAS 装着下で抗凝固療法が強力に施行されている状態で行う事になるため出血等の合併症に対し十分な留意が必要である。しかし低心機能による他臓器への循環不全が VAS 装着により改善した状態で細胞採取を行うことが可能となる利点がある。
- 4) このような重症心不全患者では早期の心機能改善効果は得難い場合もあり、将来心臓移植を必要とする可能性を考慮し移植禁忌となる感染症や悪性疾患の有無を事前に検索する事が望ましい。

第2章 安全性と有効性の評価

再生医療臨床研究の実施にあたっては、投与される細胞や細胞シートなどの安全性に十分に注意し、被験者の安全の確保に努めなければならない。また、有効性は慎重かつ客観的に判定しなければならない。安全性と有効性の評価判定方法については事前に十分な検討を行う必要がある。また安全性と有効性に関しては、少なくとも1年間の定期的観察と評価を必要とする。

1. 安全性評価と有効性評価に分けて症例報告書に記載すること。
2. 安全性評価項目としては、危惧される特定の副作用があればそれを評価項目に加え、ない場合は有害事象の発生の有無と程度を記載する。
3. 有害事象が発生したときには、研究者は速やかに総括責任者へ有害事象名、細胞移植日、発現日、処置、記載時の転帰らに関して報告する。総括責任者が臨床試験の継続が困難と判断した場合は、試験を中止とする。総括責任者は細胞移植との因果関係らに関して調査し、可能な限り、回復まで追跡調査を行う。
4. 以下の基準に合致する場合は直ちに臨床試験を中止する。
 - a) 被験者から臨床試験への参加の辞退の申し出があった場合

b) 総括責任者もしくは医師の判断による場合

① 有害事象が発現した場合

② 重大な臨床試験実施計画書違反が明らかになった場合

5. 安全性と有効性評価項目としては、以下の観察と検査を行うこととする。学会等で標準的に使用されている評価スケールを用いる場合は、別紙に添付する。

＜安全性・有効性の評価項目＞

以下の項目等についてスケジュール表を作成し、各項目の内容を別途補足説明する。「同意取得」「休薬期間」「細胞治療開始日」「後観察期間」などの期間ごとに分け、可能な限り患者来院毎に観察・検査項目を記載する。

- 1) 患者背景：合併症、既往歴、原病歴、前治療など
- 2) 自覚症状の確認：問診等により確認する。症状日誌がある場合は参考にする。
- 3) 有害事象と副作用の確認：有害事象には、各種検査異常値も含める。内容、発現時期、消失時期、程度、処置、転帰、細胞治療との関連性等をカルテおよび症例報告書に記載する。必要があれば追跡調査する。
- 4) 血圧、脈拍数
- 5) 血液検査：検査項目を記載する。
- 6) 血液生化学検査：検査項目を記載する。
- 7) 尿検査：検査項目を記載する。
- 8) 標準 12 誘導心電図
- 9) その他の特殊検査

具体的には、以下の項目を細胞シート移植前、3ヵ月後、12ヵ月後に検査し、安全性と有効性を評価する。安全性に関しては、一般的検査以外に、胸部 CT 検査によりシート内の腫瘍や石灰化の有無を検討することや、Holter 心電図や加算平均心電図などで致死的不整脈発生の可能性を調べることが必要である。

① 臨床症状の観察

- ・バイタルサイン：血圧（収縮期、拡張期）、脈拍、体重、体温
- ・臨床症状：NYHA 分類
- ・臨床症状－自覚症状：安静時息苦しさ、労作時息切れ、睡眠時息苦しさ、動悸、

倦怠感・易疲労感

- ・身体所見：湿性ラ音、浮腫、過剰心音

② 血液検査・尿検査

・血液学的検査：赤血球、ヘモグロビン値、白血球数、血小板数、白血球分画

・生化学的検査：血清電解質（Na, K, Cl）、BUN、クレアチニン、血糖、尿酸、

総蛋白、アルブミン、カリウム、リン酸、総ビリルビン、
抱合型ビリルビン、AST、ALT、アルカリフォスファターゼ、
LDH、CPK、CRP、BNP

・尿検査：尿蛋白、尿糖（定性）、潜血、ケトン、PH、沈査

③ 動脈血ガス検査

④ 標準 12 誘導心電図

⑤ Holter 心電図、加算平均心電図

⑥ 胸部 CT：シート内の腫瘍や石灰化の有無をみる

⑦ 心臓超音波検査

- ・左室駆出率
- ・左室拡張末期径

⑧ 胸部レントゲン 2 方向

- ・心胸郭比

⑨ 心筋シンチグラフィ

- ・移植部位の血流の定量化

⑩ カテーテル検査

- ・左室駆出率
- ・左室拡張末期圧

<不整脈に関する検査>

移植した細胞シートによって致死性不整脈が誘発される可能性がある。従って、致死性不整脈が起る可能性に関して十分なインフォームド・コンセントを行う。さらに致死性不整脈発生を予測するための以下の検査を行い、必要に応じ抗不整脈薬や植込み型除細動器（ICD）挿入を考慮する。

1) 標準 12 誘導心電図

標準 12 誘導心電図上の QRS 時間、QT 間隔の評価は、各々心室の脱分極時間、

再分極時間の指標として重要である。術前後で比較した QRS 時間の延長は、脱分極異常の発生/進行を示唆する。特に 12 誘導心電図上の最大 QT 時間と最小 QT 時間の差である QT dispersion が延長した場合は、再分極時間の不均一性の存在を疑う。また、心電図上で心室性期外収縮、非持続性/持続性心室頻拍を確認した場合、その発生起源の推定が可能である。

2) Holter 心電図

24 時間長時間心電図記録により、不整脈の検出、重症度の評価を行う。非持続性心室頻拍（3 連発以上、心拍数 100 回/分以上）や、1 時間に 10 個以上出現する心室性期外刺激があり、術前と比較して有意に増加している場合には、致死性不整脈の予測因子となる。

3) 加算平均心電図

心筋障害を反映して伝導遅延が存在する場合、リエントリー性不整脈の基質となる。洞調律時の体表面心電図の加算平均により QRS 終末部に遅延電位 (Late potential: LP) が検出されれば、伝導遅延部位の存在を示唆する。本検査は、致死性不整脈予測に関する高い陰性予測値を有する。

4) T wave alternans (TWA)

必須検査ではないが、T 波交互脈を μV レベルで感知、検出する検査法であり、心室の再分極過程の周期的な異常を評価することが可能である。本検査も、致死性不整脈予測に関する高い陰性予測値を有する。ただし、TWA の出現には心拍数閾値があるため、ペーシング、薬剤負荷、運動負荷で心拍数を 110 回/分程度まで上昇させることが必要である。

5) 電気生理学的検査 (EPS)

上記の非侵襲的検査により致死性不整脈発生の可能性が高いと判断された場合、必要に応じて電気生理学的検査 (EPS) を行う。1-3 連発の心室期外刺激を用いたプログラム刺激により単形性持続性心室頻拍が誘発された場合には、リエントリーを機序とした不整脈の基質があると考えられる。一般的に、心筋梗塞後の致死性不整脈発症を予測する臨床的意義は比較的高いが、心筋症では非特異的な多形性心室頻拍が誘発される場合があり、臨床的意義は低いとされている。

<細胞シートの固定と不具合発生リスク>

細胞シートは、接着性細胞を底面に温度応答性ポリマーをグラフトした温度応答性培養皿上で培養することで作製される。細胞培養中に培養温度を通常の 3

7℃から32℃以下に下げること、ポリマーの疎水性が変化して細胞の接着性が弱まり、細胞がシート状に回収される。細胞シートグラフトは蛋白分解酵素を用いることなく作製されるため、細胞間マトリックス及び細胞接着因子が保たれている。細胞シートは開胸手術下において心外膜表面に移植されるが、心表面に数分間貼付するのみで接着し、原則として接着剤の使用や縫合固定などの必要はない。但し、複数の細胞シートを重ね合わせた多重細胞シートをグラフトとして使用する際に、シートの厚みが十分にある場合は縫合固定を行う場合もある。

不具合発生リスクとして以下のものが考えられる。

1. 細胞シートの接着因子は培養皿底面と接着していた側に多く存在し、移植の際にその面を組織との接着面とする必要がある。接着面を逆にして心表面においた場合は細胞シートの固定が不完全となる可能性がある。
2. 心表面での異常電気興奮回路の発生を避けるために、皺または折り返しが極力出来ないように貼付する必要がある。
3. 細胞シートは移植後に乾燥を避けるために、適宜暖めた生理食塩水等で水分を補う必要がある。
4. 心表面に出血箇所があるときは細胞シートの固定不良が生じる可能性があり、充分止血を確認する。
5. 閉胸時の縫合、洗浄操作中に細胞シート表面に触れることで、容易に剥離する可能性があるため、閉胸操作は充分注意して行う。

第3章 インフォームド・コンセント

細胞シート移植に関係する以下の項目について十分な説明を行うこと。

1. 移植した細胞シートによって致死性不整脈が誘発される可能性があること
2. 移植した細胞が腫瘍化（悪性化）する可能性があること
3. 移植した細胞シートが予期せぬ組織（骨化、石灰化、脂肪化、等）を形成する可能性があること
4. 自己細胞採取に伴う危険性
5. 細胞採取後に何らかの原因（細胞が育たない、細胞シートの感染ら）で細胞シートの移植が行えなくなる可能性があること
6. 細菌感染やウイルス感染の可能性

7. 移植手術手技に伴う危険性
8. 細胞シートの移植は、現段階では研究として行われるものであり、まだ確立された治療ではないこと
9. 細胞シート後12ヵ月以上の経過観察を必要とすること
10. その他