

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
 - 1-2. 心臓幹細胞 Cardiac Stem Cell

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
 - 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-
 - 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

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
 - 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
 - 3-3. 実用化促進のための審査指標に対する要望等
 - 3-4. 角膜再生に期待する評価指標

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

1: 大阪大学医学部附属病院未来医療センター

2: 大阪大学大学院医学系研究科外科学講座心臓血管外科

松山 晃文¹, 澤 芳樹²

1. はじめに

従来の内科的・外科的治療では救命困難であった、拡張型心筋症や心筋梗塞後の虚血性心筋症による末期重症心不全に対する治療は今なお臨床上大きな問題である。現在、末期重症心不全例に対する唯一の有効な治療法は心臓移植であるが、移植までの待機中にブリッジ (bridge to transplantation) として補助人工心臓、特に左室補助人工心臓 (left ventricle assist device: LVAD) を装着するケースがほとんどである。しかし心臓移植に関しては、移植後の免疫抑制療法に伴う感染症の危険性、遠隔期の冠動脈硬化病変の出現、絶対的なドナー不足などが深刻な問題となっており、また、現在の補助人工心臓は血栓塞栓症や感染などの合併症やその耐久性に問題があり、患者の QOL (Quality of Life) も非常に制限され、長期補助は困難である。そういった問題を解決するために、更なる長期補助が可能な補助人工心臓や、完全置換型人工心臓の開発などについての研究が行われているが、十分満足のいく結果は得られていないのが現状であった。

幸いなことに、末期重症心不全での LVAD 装着術後に自己心機能が改善し、LVAD からの離脱が可能となる症例、いわゆる LVAD の “Bridge to Recovery” use が報告されつつある。しかし、病態が十分に解明されておらず、また離脱症例は LVAD 装着例のごく一部に過ぎず、長期離脱例は少なく再度 LVAD 装着や心臓移植を要する症例が認められるなど残された課題も少なくない。また、離脱例において LVAD に起因する合併症や LVAD 装着に対する肉体的、精神的負担から解放されるものの、不全心の心機能の程度により患者の QOL は大きく制限されるということからも、さらにもう一段階心機能を改善させるための新しい治療法の開発が待たれていた。

元来心筋細胞は分裂能が低いとされるが、骨格筋に含まれる「筋芽細胞」は筋肉が損傷を受けたときに分裂して修復する。心筋と骨格筋とは構造、機能、顕微鏡的外観に類似する部分が多く、そのため骨格筋由来の「筋芽細胞」によるは傷害心筋の治療が試みられている。また、骨髄由来細胞には血管内皮前駆細胞が存在することが示され、その血管新生作用に期待がもたれている。これらの治療法、すなわち「骨格筋芽細胞による傷害心筋の修復治療」と骨髄由来細胞による血管新生治療」を組み合わせることで良好な治療効果を得られると考えるのはまさに合理的である。

LVAD 装着と上記のような心筋再生医療を併用することで、十分な心機能の改善が期

待されよう。またその結果、一旦装着した LVAD からの離脱が可能となれば、これまで心臓移植、LVAD 装着のみでしか救命できなかった患者を救命でき、LVAD の合併症のリスク軽減、移植待機中の患者の QOL 向上につながると思われる。そこで我々は、従来の内科的治療法では救命困難であった左室補助人工心臓 (LVAD) 装着を装着した末期的虚血性心筋症の症例に対し、骨格筋より単離した自己筋芽細胞をシート化して不全心に移植することにより左室機能の改善を目指し、その治療法の安全性を検討するとともに被験者の術前・術後の心機能を比較評価することを目的として臨床試験を開始したのである。

2. 症例

56 歳男性 拡張型心筋症

現病歴：56 歳 男性

診断：DCM

現病歴・入院歴：2004 年より胸部 X 線写真上、心拡大を指摘されていたが、日常生活は問題なかった。2006 年 1 月 26 日、呼吸困難が突然出現し、近医入院。同 2 月 12 日心不全悪化によりカテコーラミン投与を開始した。2 月 14 日心不全の増悪著しく大阪府立急性期医療センターへ転院、IABP 挿入、挿管となった。2 月 15 日には PCPS 挿入、無尿のため CVVHD が開始された。当日、心筋生検による組織学的検討にて拡張型心筋症と診断された (図 1)。2 月 22 日阪大病院へ転院し、同日 LVAS および RVAS-ECMO を装着し、救命を図った。3 月 1 日 RVAS-ECMO は離脱することができた。3 月 31 日 CVVHD 離脱。その後徐々に全身状態は改善した。しかし、11 月 9 日、12 月 14 日に施行されたオフテストの結果にて LVAS 離脱は困難と判断された。患者本人ならびに家人の書面に手の了解のうえ、細胞再生医療による治療を開始することを決定、2007 年 3 月 30 日骨格筋芽細胞の採取目的にて局麻下にて大腿四頭筋より約 10g の骨格筋を採取、細胞治療プロトコールにのっとり、無菌的細胞調整施設 (CPC) にて培養を開始した。4 月 24 日に継代した骨格筋芽細胞を回収・凍結。5 月 24 日解凍して再培養を開始、5 月 28 日温度応答性培養皿へ播種した。5 月 30 日細胞シート移植術施行 (図 2)。7 月 12 日、8 月 30 日、オフテストを施行。LVAS 離脱可能と判断、9 月 5 日には LVAS を離脱し、以降経過良好。離脱後 3 ヶ月を越えても全身状態が安定しており、12 月 20 日退院となった。細胞移植後に BNP 値が低下しており、細胞移植により心不全が改善していることが明らかとなった (図 3)。

3. 骨格筋芽細胞による治療戦略

元来心筋細胞は分裂能がないために一旦傷害を受けると心筋の修復はできないか、修復できたとしてもごく限られた回復でしかない。一方で骨格筋に含まれる「筋芽細胞」は筋肉が損傷を受けたときに分裂して修復する。心筋と骨格筋とは構造、機能、顕微鏡的外観に類似する部分が多く、そのため骨格筋由来の「筋芽細胞」は傷害心筋も修復しうると考えられている。実際に海外では自己骨格筋芽細胞の心筋への移植が臨床的に応用されつつある。拡張型心筋症には有効と考えるのに難くない。なんとなれば、拡張型心筋症は心筋細胞そのものの疾患であるため、血管網は維持されていると予想され、消失した心筋細胞あるいは機能細胞のみの供給でそれらが生着すると推定されるからである。現在の拡張型心筋症にたいする細胞再生医療のモデル動物の多くはパーシングモデル等であり、線維化が進行している症例で有効であるかは確定的なことは言えないのが実情である。しかし、骨格筋芽細胞を移植すると配向性をもって生着するのみならず、それら細胞をシート化したのちに mechanical stretch を加えると細胞の配列に配向性が生じる。従って、筋芽細胞を拍動している心筋に移植することは、mechanical stretch の加わっている場で、ふさわしい分化をしているのかもしれない。一方、動物実験において、移植した骨格筋芽細胞すべてが生着しているわけではなく、いわゆるサイトカインデリバリーシステムとして骨格筋芽細胞シートが機能している可能性もある。

4. おわりに

骨格筋芽細胞のシート化による再生医療は、移植細胞の生存効率の向上という点でも利にかなった治療法である。次世代の細胞シート治療においては、機能細胞のみならずその機能を維持・亢進するための血管網の同時構築も求められるであろう。細胞移植医療の黎明から筋芽細胞シート。いつかは細胞を用いずとも治癒できる日が来ることに想いをはせるものである。

図1: 心筋生検による組織学的検討

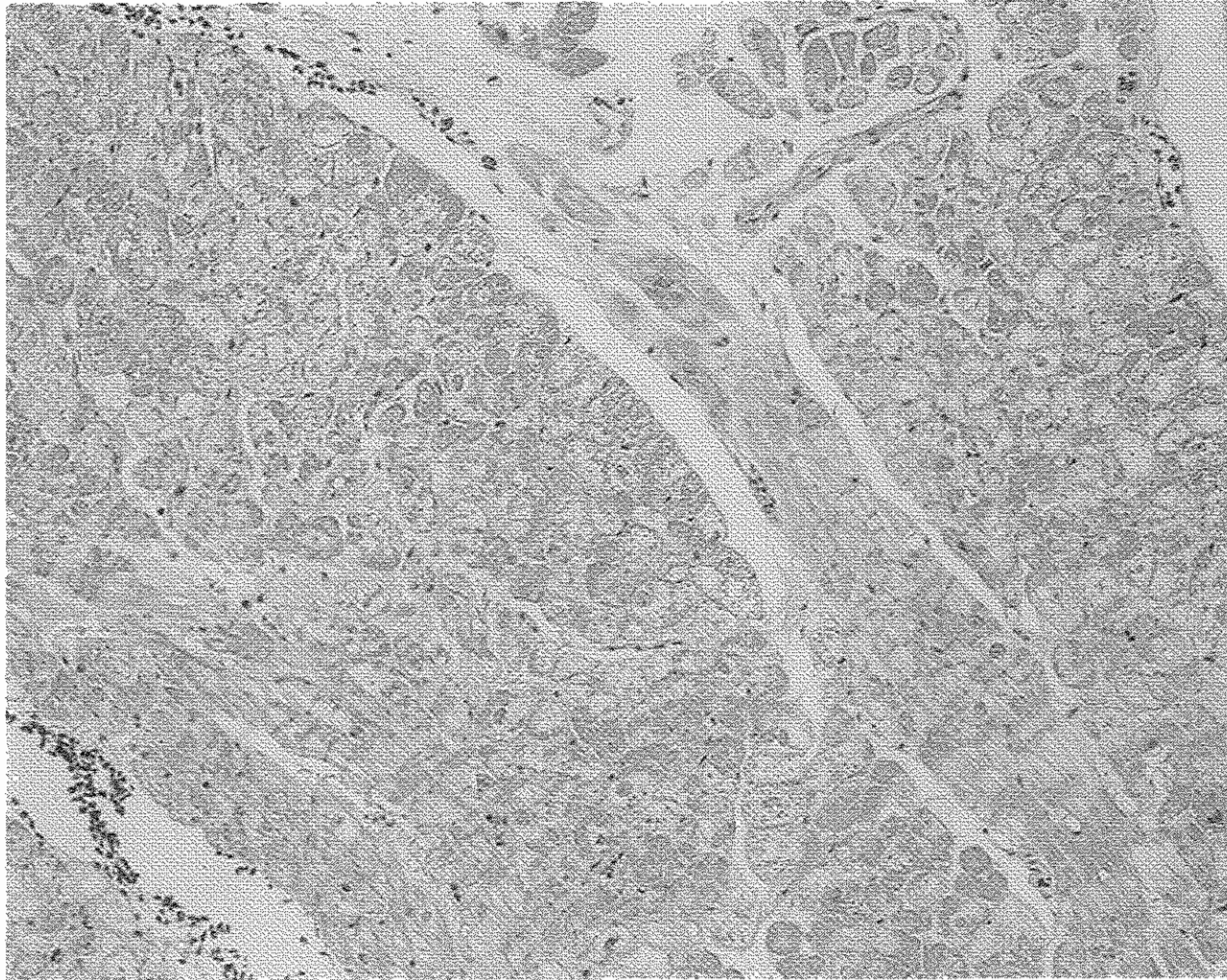


図2:細胞シート移植

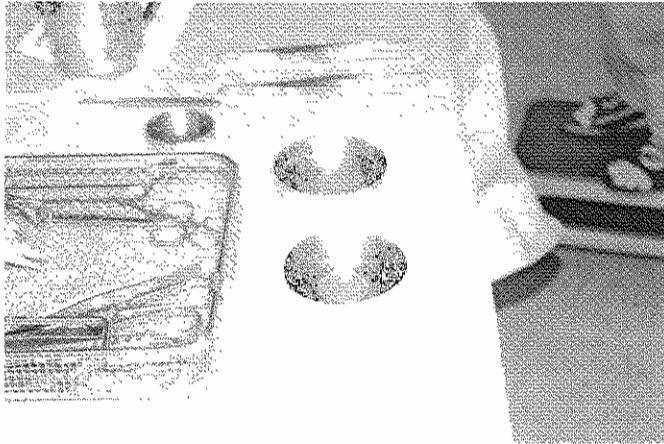
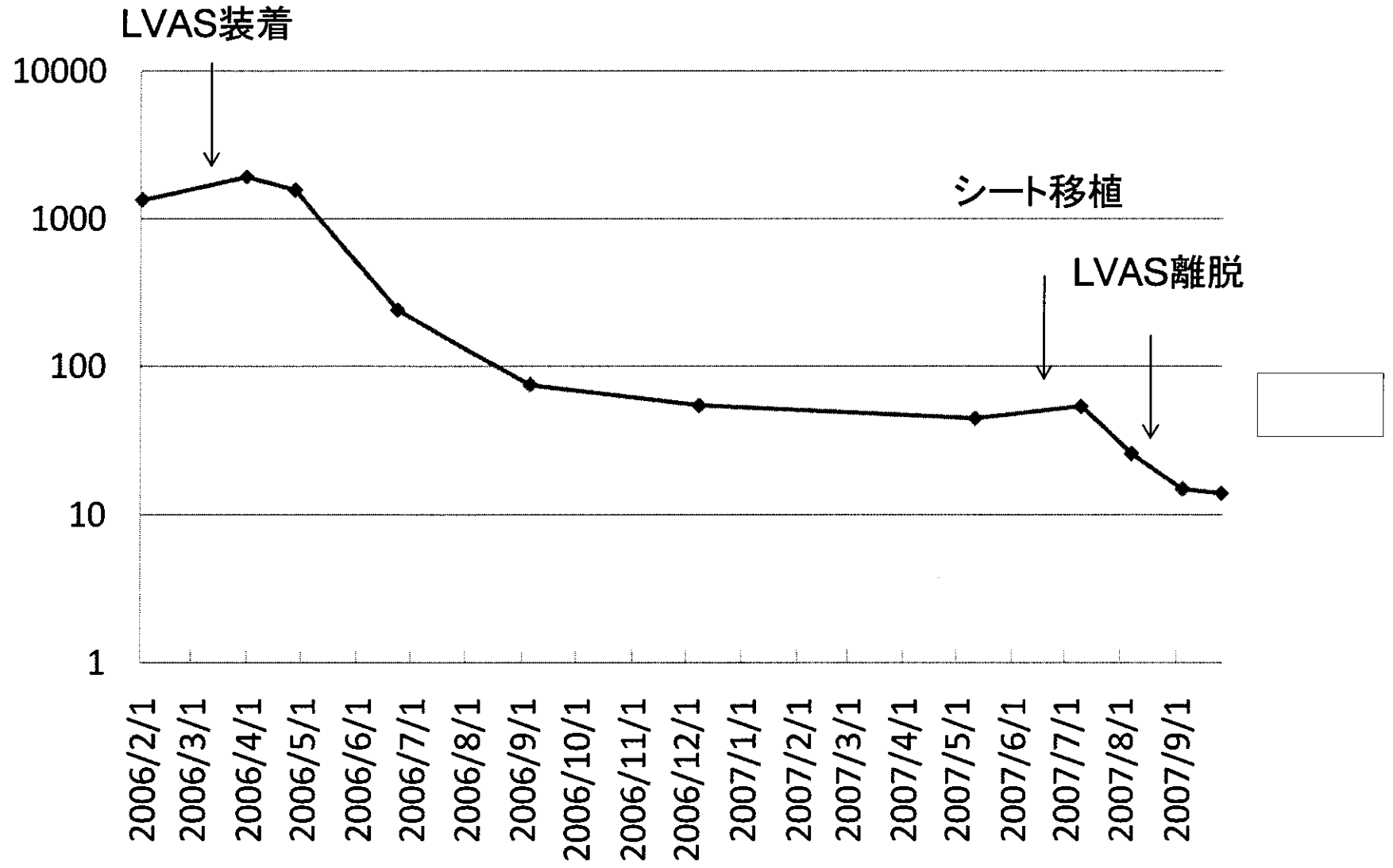


図3:BNPの推移



1-2. 心臓幹細胞 Cardiac Stem Cell

- 1: 先端医療振興財団先端医療センター血管再生研究グループ
- 2: 理化学研究所発生再生科学総合研究センター幹細胞医療応用研究チーム
- 3: 東海大学医学部基盤診療系再生医療科学
川本 篤彦*^{1, 2}, 浅原 孝之*^{1, 2, 3}

はじめに

哺乳動物の心筋細胞は正常の心臓発生後に細胞分裂を停止するため、成体の心臓は終末分化臓器であり、組織障害に対する内因性再生能力はないと長い間信じられてきた。一方、ほとんどの臓器から組織特異的な成体幹細胞が同定され、各組織の維持に重要な働きを示すことが明らかになってきた。もう一つの最終分化臓器と信じられてきた脳からも神経幹細胞が同定されるなか、心臓は唯一幹細胞の欠如した再生能力のない臓器と考えられてきた。

しかし、近年この概念は劇的な変化を遂げることとなった。すなわち、(1) 有糸分裂・細胞質分裂を示す心筋細胞が、正常および病的状態（心筋梗塞、心不全など）のヒト心臓に稀ながら存在することが証明され、(2) 女性ドナーから男性患者へ行われた心臓移植例で、移植された女性心臓組織内に男性由来の心筋細胞が同定されたことから、心臓外の幹細胞が心筋細胞再生に貢献し得ることが明らかになり、さらに(3) 各種哺乳動物の心臓組織に心臓幹細胞が存在するとの報告が相次いだ。

従来、心筋梗塞などの組織障害に対しては、失われた心筋細胞を再生する手段がなかったため、重篤な患者の予後を改善させることは困難であった。しかし、近年の新しい知見は、幹細胞を用いた心筋再生医療の有用性を強く示唆し、心疾患治療の大いなる進歩に繋がると期待されている。

本稿では、これまでに同定された心臓幹細胞の細胞生物学的特性、動物実験における細胞移植などの心筋再生治療成績を紹介し、今後の展開についても言及したい。

心臓幹細胞

各種心筋幹細胞の特性を表1にまとめた。

(1) c-kit 陽性細胞

2003年ニューヨーク医科大学の Anversa 教授の研究グループは、成体ラットの心臓間質組織内に心筋細胞 10^4 個あたり平均1個の頻度で、幹細胞表面抗原である c-kit 陽性を示すが、造血系の成熟細胞マーカーである Lineage (Lin) には陰性の心臓幹細胞を初めて発見した。この心臓幹細胞は、汎白血球マーカーの CD45、造血幹細胞/血管内皮前駆細胞マーカーの CD34 には陰性を示すが、7-10%で心筋転写因子 (Nkx2.5、GATA-4、MEF2C) を、0.5%未満で構造タンパク (α -sarcomeric actin、cardiac myosin、

connexin 43 など) を発現していた。つまり、成体心臓内の c-kit 陽性 Lin 陰性細胞は、均一な細胞集団ではなく、心筋細胞系列へ分化し始めた心筋前駆細胞やさらに分化が進み構造タンパクも発現するようになった細胞などが混在していることが示唆された。Anversa らは、さらに単一の c-kit 陽性 Lin 陰性細胞の継代培養により、本心筋幹細胞の細胞株化に成功した。c-kit 陽性細胞株は *in vitro* で心筋細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞などの細胞系列マーカーに陽性を示したことから、本心筋幹細胞の多分化能が証明された。続いて、ラット心筋梗塞モデルを用いて、同培養幹細胞を梗塞境界領域の心筋内へ移植した。移植された EGFP 導入心臓幹細胞は、*in vivo* でも心筋細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞への分化を示した。再生された心筋細胞の電気生理学的検査（活動電位の記録）で、同細胞が心筋細胞として機能していることも確認された。細胞移植後の心エコー検査、左室内圧検査で、左室機能は対照群に比して心臓幹細胞移植群で有意に改善していた (1)。

同研究グループは、その後、マウス、イヌ、ブタ、ヒトでも心臓幹細胞を同定した。ヒトの場合、わずか 30 mg の心臓小切片からでも高頻度に (12 例中 8 例) 心臓幹細胞の分離が可能であり、分離後の培養増幅も 70 例中 46 例で成功したという。培養増幅された細胞は、上記のラット幹細胞と同様に、*in vitro*、*in vivo* で多分化能、心筋再生能を示すことが確認されている (2)。将来の臨床適用を考えた場合、分離・増幅をより確実に行うために必要な切片サイズの設定など、詳細な戦略が必要になると考えられるが、基礎技術は既に確立されており、米国では心臓幹細胞移植の臨床試験計画も進行している。

ヒト心臓 c-kit 陽性心臓幹細胞は、生理的条件下ではほとんど細胞周期が静止しており、わずかに恒常性維持のために分裂し、少数の心筋細胞を置換している。しかし、急性・慢性心筋虚血、大動脈弁狭窄症、加齢などのストレスに伴って心臓幹細胞の細胞周期が活性化され、心臓組織内でその数を増加させることが知られている。このような病態下では、周囲の障害心筋細胞から insulin-like growth factor 1 (IGF-1)、hepatocyte growth factor (HGF)、stromal-derived factor-1 (SDF-1)、Transforming growth factor (TGF) β などの成長因子が発現し、興味深いことに心臓幹細胞はこれらの成長因子の受容体を発現する。つまり、心筋障害発生時には、心筋細胞と心臓幹細胞の間でサイトカイン・成長因子を介したクロストークが活性化され、組織修復に貢献すると考えられている (3)。この現象を利用して、幹細胞移植とは別に、外因性の成長因子を障害心筋へ注入することにより、内因性の心筋幹細胞を刺激して、心筋再生を促進させようとする試みもある。マウス、イヌ、ブタの心筋梗塞モデルで虚血部に IGF-1 および HGF を注入すると、心臓幹細胞が周囲組織から梗塞部へ遊走し、心筋修復が促進されることが判明している (4)。将来の臨床適用に際して、細胞移植では、それに先立つ細胞採取のために開心術や心筋生検などの侵襲的処置が必須になることを考慮すると、成長因子注入療法は魅力的なオプションになる可能性がある。

(2) Sca-1 陽性細胞

Oh ら (5) および Matsuura ら (6) は、成体マウスの心臓組織中の Sca-1 陽性細胞分面に心臓幹細胞が存在することを報告した。Oh らによると、心臓 Sca-1 陽性細胞は、Anversa らの c-kit 陽性細胞と同様に、Lin、CD34、CD45 が陰性であるが、興味深いことに c-kit 陰性 (Matsuura によると約 40% で CD45 陽性、約 9% で c-kit 陽性) であるという。心筋転写因子に関しては、Nkx2.5 陰性であったが、GATA4、MEF2C、TEF-1 は発現していた。このように Sca-1 陽性細胞は、心臓からの分離直後では c-kit 陽性細胞と異なった特性を示すが、一方、後述する心臓 side population (SP) 細胞とは似通っており、Oh らによると心臓 SP 細胞の 93% 以上が Sca-1 陽性であるという。

心臓 Sca-1 陽性細胞は、5-azacytidine または oxytocin の存在下で培養すると心筋収縮タンパクの遺伝子・タンパクが発現するようになり、oxytocin 存在下では自律拍動も誘導された。また、マウス心筋虚血再灌流モデルへ非培養 Sca-1 陽性細胞を静脈内移植すると、2 週間後に心筋細胞への分化と宿主心筋細胞との融合を通じて心筋再生を促したという。

以上のように、Sca-1 陽性細胞分面には、心筋再生治療に有用な心臓幹細胞が存在することが示唆されるが、Sca-1 分子の存在はマウス以外の動物種で確認されておらず、当然抗ヒト Sca-1 抗体も存在しないため、ヒトから Sca-1 陽性細胞を分離し、同細胞分面移植を臨床適用することは現時点では不可能である。

(3) 心臓 Side population (SP) 細胞

SP 細胞は、蛍光色素 Hoechst 33342 に非染色性で、ATP-binding cassette transporter である ABCG2 を発現している細胞集団である。当初、骨髄から造血幹細胞分面として分離されたが、以後、肺、乳腺、精巣、腎臓、皮膚、骨格筋などからも分離された。このうち、骨格筋 SP 細胞は骨格筋細胞への分化能を有し、骨髄 SP 細胞とは異なる特性を示すことが明らかになっている。最近になって、成体マウス心臓からも SP 細胞が分離され、その特性について研究が進んでいる。Pfister ら (7) によると、心臓 SP 細胞は、骨髄 SP 細胞と同様に Sca-1、CD31 に高頻度で陽性を示すが、CD45、CD44、CD34、c-kit はほぼ陰性である点で、骨髄 SP 細胞とは異なる。心臓 SP 細胞のうち、Sca-1 陽性 CD31 陰性分面 (全心臓 SP 細胞の約 10%) は、in vitro で細胞融合によらず機能的な心筋細胞へ分化し得るが、Sca-1 陽性 CD31 陽性分面 (全 SP 細胞の約 70%) は心筋転写因子や収縮タンパクを発現せず、心筋再生能に乏しいと報告されている。

Oyama ら (8) は、新生仔ラットから心臓 SP 細胞を分離し、in vitro で oxytocin または trichostatin A 存在下に自律拍動を開始することを報告した。同細胞は、in vivo (凍結障害モデル) で静脈内移植されると、心臓の障害部位へ生着し、心筋細胞・血管内皮細胞・平滑筋細胞へ分化したという。

心臓 SP 細胞は、以上のように心筋再生治療へ適用しうるポテンシャルを有すると考えられるが、その分離に Hoechst 33342 という蛍光色素とフローサイトメトリー法を要する点で臨床適用には大きな壁があり、今後の解決が期待されている。

(4) Islet-1 陽性細胞

LIM-ホメオドメイン転写因子である *islet-1* は、胎生期の心臓形成領域に発現し、*islet-1* 陽性細胞は流出路、心房、心室筋の一部を形成する。Laugwitz ら (9) は、*Islet-1* 陽性細胞がその後、心臓発生が進むにつれて減少するが、新生仔マウス、ラットおよび新生児の心臓に残存することを報告した。これら *islet-1* 陽性細胞は、*c-kit*、*Sca-1* は陰性であるが、心筋転写因子 *Nkx2.5*、*GATA4* を発現し、新生仔心筋細胞と共培養すると、細胞融合によらず、成熟心筋細胞へ分化するという。

出生後の *islet-1* 陽性細胞は、現時点では新生仔・新生児の心臓のみから極めて少数が検出されているにすぎない。今後、出生早期を過ぎた成体の心臓からでも *islet-1* 陽性細胞を分離可能か、また分離後に効率よく培養増幅できるか、さらに動物モデルで損傷心筋を再生し得るか、興味が尽きない。

(5) Stage-specific embryonic antigen (SSEA-1) 陽性細胞

Ott ら (10) は、新生仔および成体ラットの心室組織から、ES 細胞マーカである SSEA-1 陽性細胞を分離した。SSEA-1 陽性細胞は、新生仔心では心筋転写因子 *Nkx2.5*、*GATA4* および収縮タンパクのミオシン重鎖を発現しているが、成体ではこれらの発現を失っていた。以上から、成体における SSEA-1 陽性細胞は、より未分化な心臓前駆細胞 (uncommitted cardiac precursor cells: UPCs) ではないかと推測されている。UPC を心臓由来の間葉系細胞フィーダーと共培養すると、UPC は経時的に、まず中胚葉マーカの *flk-1* を発現し、その後 *flk-1* 陽性 *sca-1* 陽性 (50% で *c-kit* も陽性) を経て、一部は *nkx2.5* 陽性、*GATA-4* 陽性、*islet-1* 陽性を示した後に自律拍動する心筋細胞へ、他は平滑筋細胞、血管内皮細胞へ分化し得た。驚くべきことに、成体ラットの心筋組織 1 g から 90 日間の培養で 4.5×10^5 個の UPC が再現性をもって得られるという。In vivo では、成体ラット由来の UPC をラット心筋梗塞モデルへ心筋内注入すると、UPC は心筋・血管を形成し、梗塞範囲を減少させた。

現時点ではラットでの成績しか報告がないが、UPC は心筋再生治療のための新しいオプションになることが期待される。

(6) Cardiosphere

心臓幹細胞が小動物のみならずヒトからも採取可能であることが明らかになり、これを用いた心筋再生治療の臨床適用へ注目が高まってきた。Messina ら (11) は開胸心臓手術または経カテーテル的心内膜心筋生検を受けた患者の心房または心室組織から不

均一な心臓幹細胞集団を分離することに成功した。単一細胞からの浮遊系培養において cardiosphere というスフェロイドが形成され、その中心部には c-kit 陽性の未分化細胞、周辺部には心筋系（ミオシン重鎖、Nkx2.5、トロポニン I、心房性ナトリウム利尿ペプチドなど）、平滑筋系（smooth muscle actin）、血管内皮系（von Willebrand 因子）、間葉系（CD105、CD90）などへ分化をはじめた細胞群が同定された。ヒト cardiosphere は、単培養では自律拍動しないが、ラット新生仔心筋細胞との共培養では自律拍動が誘導される。また、単一の心筋生検組織から得られたヒト cardiosphere は約 45 日間で 1×10^7 から 10^8 個にまで増幅可能であるという。免疫不全マウスの心筋梗塞モデルに対してヒト cardiosphere を移植すると、移植された細胞の心筋細胞、血管内皮細胞への分化が免疫染色で確認された。対照群（PBS 投与群）と比較して、梗塞サイズに差はなかったが、左室機能の改善効果が認められた。

Tateishi ら (12) もヒト cardiosphere の分離・培養に成功し、これらの心臓幹細胞は稀に c-kit 陽性を示すが、造血／血管内皮系マーカの CD45、CD34、CD31 には陰性で、一方間葉系の表面マーカである CD105、CD90、CD29、CD73 や Hoechst 色素非染色に関連する ABCG2 を発現する。Cardiosphere は分化誘導培養下および in vivo で、心筋細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞への分化が確認されている。

他種的心臓幹細胞の単層培養と比較した場合、cardiosphere では 3 次元構築が得られるため、各細胞の分化・増殖に加えて、細胞間の接触（paracrine 効果）・電気生理学的連関等などの面で、心臓組織をより生理的に再生できる可能性がある。

以上の画期的な成果を受けて、cardiosphere を用いた心筋再生治療の臨床適用には大きな期待が集まっており、国内外でその準備が進んでいる。

今後の課題

（1）科学的課題

上述したように、これまでに各種の心臓幹細胞が分離されており、それぞれの表面マーカ発現パターンには共通点もあるが、異なるものも少なくない。これらの幹細胞の特性について、以下の問題が未だ明らかになっていない。

- 1) これらの幹細胞が共通の起源を有するのか？表面マーカ発現パターンの違いは、分化段階の違いを示しているのか？
- 2) これらは胎生期の心臓幹細胞が遺残したものなのか、あるいは生後に他臓器から循環血を介して到達したものなのか？

生後心臓における Islet-1 陽性細胞や SSEA-1 陽性細胞の同定は、心臓幹細胞が胎生期からの遺残であり、その後の分化段階に従って、異なった表面マーカを発現することを示唆しているが、一方で心臓移植例における宿主由来心筋細胞の移植心における同定は、他臓器から心臓への幹細胞到達も示唆している。今後の研究の発展が待たれるところである。

(2) 心筋再生治療への応用における課題

心臓幹細胞は、一般に骨髄幹細胞や骨格筋芽細胞に比して、はるかに高効率に心筋細胞へ分化し得ると考えられているが、その一方で自己複製能は他の幹細胞に比して低いとされている。現在までに同定されている心臓幹細胞の中で、どの幹細胞が最も効率よく心筋再生に貢献できるのか明らかにする必要がある。また、各心臓幹細胞の分離法、分化誘導法、培養増幅法、移植法についても、さらに改善していく余地が残されているはずである。培養技術の発展は、上述した成長因子による心臓幹細胞刺激療法をさらに発展させる可能性もある。細胞移植法については、単純な心筋内注射法だけでなく、組織工学による細胞の足場、心筋シートの応用などについても詳細に検討していく必要がある。

また、心臓幹細胞を用いた心筋再生治療は、上述した通り動物実験のレベルでは有効性が報告されているが、その臨床適用に際しては、細胞採取のために開胸手術や心筋生検検査というリスクと侵襲が比較的高い手技を要することに留意する必要がある。つまり、より容易に採取・分離可能な骨髄・末梢血・臍帯血・脂肪組織・骨格筋などに由来する幹細胞の移植治療を明らかに凌駕する効果が得られるのか、そのリスク・ベネフィット論を確立する必要がある。成長因子による心臓幹細胞刺激療法との優劣についても同様に検討されるべきである。

最後に、心臓幹細胞に限らず、ヒト幹細胞を培養加工して治療に用いる際には、加工品（幹細胞）の製造・品質管理過程の安全性を客観的に担保しうる Cell Processing Center 施設とその運営体制の確立が望まれることは言うまでもない。上述したように、心臓幹細胞における細胞系列マーカの発現パターンが一様でなく、さらに分化誘導時にそれらのパターンが変化することを考慮すると、最終加工品たる移植細胞の規格をどのように規定すれば、治療の安全性・有効性を真に担保し得るのかという難しい問題に突き当たると予想される。慎重な前臨床試験の積み重ねによる今後の解明が待たれるところである。

表1: これまでに報告された心臓幹細胞の特性

幹細胞タイプ	c-kit 陽性細胞	Sca-1 陽性細胞	心臓 SP 細胞	Islet-1 陽性細胞	SSEA-1 陽性細胞	Cardiosphere
細胞系列マーカー	(+) c-kit (±) Nkx2.5, GATA4, MEF2C (-) CD45, CD34, Lin	(+) Sca-1, GATA4, MEF2C (-) CD45, CD34, Lin,	(+) Sca-1, ABCG2 (±) CD31 (-) CD45, CD34, Lin, c-	(+) islet-1, Nkx2.5, GATA4 (-) c-kit, Sca-1	(+) SSEA-1 (±) Nkx2.5, GATA4, MHC	(+) c-kit(?), CD90, CD105, MHC, TnI, Nkx2.5, ABCG2 (-) CD45, CD34, Lin
動物種	マウス, ラット, イヌ, ブタ, ヒト	マウス	マウス	マウス, ラット, ヒト	ラット	マウス, ブタ, ヒト
細胞株化	Yes	ND	ND	ND	ND	Yes
自己複製能	Yes	ND	ND	Yes	ND	Yes
多分化能	Yes	Yes	Yes	ND	Yes	Yes
心筋細胞分化誘導法 (in vitro)	単独培養	単独培養	単独培養 成体心筋細胞との共培	新生仔心筋細胞との共培養	間葉系細胞フィーダーとの共培養	単独培養 新生仔心筋細胞との共培養
心筋再生能 (in vivo)	Yes	Yes	Yes	ND	Yes	Yes

SP, side population; SSEA-1, stage-specific embryonic antigen-1; Lin, lineage; MHC, myosin heavy chain; TnI, tropinin I; ND, not determined (未確定).

文 献

1. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, 2003;114:763-776.
2. Bearzi C, Rota M, Hosoda T, et al. Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007;104:14068-14073.
3. Torella D, Ellison GM, Karakikes I, et al. Growth-factor-mediated cardiac stem cell activation in myocardial regeneration. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2007;4 supplement 1: s46-s51.
4. Linke A, Muller P, Nurzynska D, et al. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005;102:8966-8971.
5. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: Homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003;100:12313-12318.
6. Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, et al. Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 2004;279:11384-11391.
7. Pfister O, Mouquet F, Jain M, et al. CD31- but not CD31+ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation. *Circ Res*, 2005;97:52-61.
8. Oyama T, Nagai T, Wada H, et al. Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo. *J Cell Biol*, 2007;176:329-341.
9. Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, et al. Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature*, 2005;433:647-653.
10. Ott HC, Matthiesen TS, Brechtken J, et al. The adult human heart as a source for stem cells: repair strategies with embryonic-like progenitor cells. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2007;4 suppl 1:s27-s39.
11. Messina E, De Angelis L, Frati G, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*, 2004;95:911-921.
12. Tateishi K, Ashihara E, Honsho S, et al. Human cardiac stem cells exhibit mesenchymal features and are maintained through Akt/GSK-3b signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007;352:635-641.

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

東北大学医学部眼科

西田 幸二

<緒言>

角膜は角膜上皮、実質、内皮の三層からなる透明な組織である（図1）。角膜内皮は角膜の最内層に存在する単層の細胞からなる組織である。角膜内皮の主な機能としては、外敵の侵入を防ぐためのバリア機能と角膜の水分量を一定に保つためのポンプ機能があり、角膜の透明性維持に重要な役割を果たしている。

角膜内皮は生体内では増殖しないため、一度損傷を受けると内皮細胞数は回復することはない。正常では 2500-3000 cells/mm² ある角膜内皮細胞が 500 cells/mm² 以下に減少すると、ポンプ機能の低下により不可逆的な角膜浮腫をきたし、水疱性角膜症と呼ばれる著しい視力低下を来す。水疱性角膜症は、角膜移植が必要となる疾患で最も多く、その治療方法としてはドナー角膜を用いた全層角膜移植が行われているが、他家移植であるため拒絶反応を生じ、長期成績は必ずしも良好ではない。さらに、国内においては深刻なドナー不足の問題を抱えており、国内における角膜移植は海外輸入ドナー角膜に頼っているのが現状である。

近年、全層角膜移植による拒絶反応の軽減を目的として、DSAEK (Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty) という新しい手術方法などが開発され、よりよい視機能が得られている。角膜内皮は角膜の内側の細胞であり、角膜内皮の病気に対しては、角膜全層をドナー角膜で置換する全層角膜移植が施行されてきた。DSAEK とは角膜内皮のみを移植する術式であり、ホスト角膜実質や角膜上皮は温存するものである。この方法では、眼球の中に移植片を入れて、角膜裏面に貼り付けるというものである。DSAEK が開発されたのは数年前であるが、今では DSAEK で行われるケースが多くなり、全層角膜移植に取って代わる勢いである。しかしながら、DSAEK も内皮と実質の一部を含んだ他家移植であるため、拒絶反応の軽減は期待できるものの、ドナー不足の問題に対しての解決策とはならない。

<角膜内皮再生に関する研究開発状況>

上述の問題を解決するために、主に国内研究施設において、再生医療的アプローチによる水疱性角膜症に対する治療方法の研究開発が行われている。ヒト角膜内皮細胞は *in vivo* においては増殖しないが、*in vitro* においては増殖可能であることが知られている⁽¹⁻³⁾。近年、健常ドナー角膜の角膜内皮細胞を *in vitro* で培養した後、培養角膜内皮細胞を水疱性角膜症の動物モデルに移植する試みがなされている。その方法としては、

筆者らが開発した温度応答性培養皿上でヒト角膜内皮細胞を培養し、キャリアを用いずに移植する方法⁽⁴⁻⁵⁾ (図2)、羊膜やコラーゲンシートをキャリアに用いてヒト角膜内皮細胞を培養し、作製した培養内皮細胞シートを移植する方法⁽⁶⁻⁸⁾、角膜内皮の前駆細胞を sphere 法で単離し疾患眼に移植する方法⁽⁹⁻¹⁰⁾などが報告されている。いずれの培養角膜内皮移植も、家兎やサルの水疱性角膜症モデルにおいてその有効性が示されている。最近では、海外施設においても同様の研究成果が報告され始めている⁽¹¹⁻¹²⁾。これら他家細胞による培養角膜内皮移植法は、ひとつのドナー角膜から複数の患者への移植が可能であるため、国内のドナー不足問題の解決に大きく寄与するものと考えられる。前述の DSAEK において角膜内皮の移植手技はすでに確立されており、この手術手技を利用することで、培養内皮細胞移植を臨床応用することは可能である。今後の課題としては、培養角膜内皮の製造施設 (CPC : Cell Processing Center) の整備や品質管理 (細胞密度、マーカー発現、内皮機能の評価方法) など課題も残されているものの、近い将来に臨床応用が開始されるものと思われる。

他家角膜内皮を用いた角膜内皮再生技術は、わが国を含めた多くの国におけるドナー不足の問題を解決しうる大きな可能性を持っている。しかし、拒絶反応の問題に対しては、全層角膜移植に比較しての軽減は期待できるものの、根本的な解決策とはならない。ドナー不足および拒絶反応の問題を両方解決する方法としては、患者自身の細胞でかつ角膜内皮以外の部位 (細胞) を細胞源として用い、角膜内皮を再生することが理想的である。しかし現状では、適切な細胞源の選択と角膜内皮への分化誘導法の開発が研究課題となっている。

<産業化の状況>

角膜内皮再生医療の早期実現化、標準医療としての定着には産業化が不可欠である。水疱性角膜症の国内における患者数は年間 1000 人以上、米国においては 10000 人以上と推測されており⁽¹³⁾、世界的に見れば産業化可能な領域であると考えられる。産業化という観点からは、1つのドナー角膜から複数の培養角膜内皮が作製可能な他家による角膜内皮の再生医療がビジネスモデルとしては適している。一方で、自家の角膜内皮再生は、医学的・社会的にも理想的な治療方法になりうると考えられるが、産業化という観点からはややハードルが高くなると考えられる。企業に関しては、角膜内皮の産業化はビジネス的にも十分に可能であり、国内においては興味を持っている企業はいくつかあるが、諸事情によりここでは具体的に企業名を記載するのは避ける。筆者らも角膜内皮の産業化に興味を持っている会社いくつかと交渉を開始している。米国においては、患者数が多いもののドナー角膜の提供数が豊富であるため、現時点では角膜内皮再生への積極的な企業参入はないが、皮膚再生領域では培養皮膚など既に商品化されており、今後の企業参入は十分に考えられる。欧州については、現時点での角膜内皮再生領域において目立った動きは見られないが、米国と異なり日本同様にドナー角膜不足の問題を

抱えているため、角膜内皮再生医療に対する潜在的なニーズは存在すると考えられる。

角膜内皮再生医療の実現は、ドナー角膜の絶対的不足を抱えているわが国にとって、大きな医学的、社会的意義を持っている。自家移植が理想的であるが、欧米諸国やわが国におけるドナー角膜の不足や対象疾患の多さを考えると、他家角膜内皮を用いた角膜内皮再生技術の産業化も社会的意義は大きく、ビジネス的にも十分に成立すると考えられる。既に臨床応用が開始されている角膜上皮再生医療については、国内研究チームが世界をリードしている。角膜内皮領域においても、日本発の再生医療技術として確立し、世界に向けて発信できるものと確信している。

最後に、今後の角膜内皮再生医療の産業化に向けてはガイドラインなどの整備、人材の確保など、産学官の連携により企業参入が容易な環境に整備していくことが重要と考えられる。

Reference

1. Miyata K, Drake J, Osakabe Y, Hosokawa Y, Hwang D, Soya K, Oshika T, Amano S. Effect of donor age on morphologic variation of cultured human corneal endothelial cells. *Cornea*. 2001;20(1):59-63.
2. Senoo T, Obara Y, Joyce NC. EDTA: a promoter of proliferation in human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(10):2930-5.
3. Senoo T, Joyce NC. Cell cycle kinetics in corneal endothelium from old and young donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(3):660-7.
4. Sumide T, Nishida K, Yamato M, Ide T, Hayashida Y, Watanabe K, Yang J, Kohno C, Kikuchi A, Maeda N, Watanabe H, Okano T, Tano Y. Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces. *FASEB J*. 2006;20(2):392-4. Epub 2005 Dec 9.
5. Ide T, Nishida K, Yamato M, Sumide T, Utsumi M, Nozaki T, Kikuchi A, Okano T, Tano Y. Structural characterization of bioengineered human corneal endothelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes. *Biomaterials*. 2006;27(4):607-14. Epub 2005 Aug 15.
6. Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, Connon CJ, Rigby H, Fullwood NJ, Kinoshita S. Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(3):800-6.
7. Koizumi N, Sakamoto Y, Okumura N, Okahara N, Tsuchiya H, Torii R, Cooper LJ, Ban Y, Tanioka H, Kinoshita S. Cultivated corneal endothelial cell sheet transplantation in a primate model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(10):4519-26.
8. Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Usui T, Tanaka K, Hattori S, Irie S, Miyata

- K, Araie M, Amano S. Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004 45(9):2992-7.
9. Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Yanagi Y, Usui T, Ono K, Araie M, Amano S. Sphere therapy for corneal endothelium deficiency in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(9):3128-35.
 10. Mimura T, Yokoo S, Araie M, Amano S, Yamagami S. Treatment of rabbit bullous keratopathy with precursors derived from cultured human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(10):3637-44.
 11. Lai JY, Chen KH, Hsu WM, Hsiue GH, Lee YH. Bioengineered human corneal endothelium for transplantation. *Arch Ophthalmol.* 2006;124(10):1441-8.
 12. Lai JY, Chen KH, Hsiue GH. Tissue-engineered human corneal endothelial cell sheet transplantation in a rabbit model using functional biomaterials. *Transplantation.* 2007 Nov 27;84(10):1222-32.
 13. Darlington JK, Adrean SD, Schwab IR. Trends of penetrating keratoplasty in the United States from 1980 to 2004. *Ophthalmology* 2006;113:2171-2175.

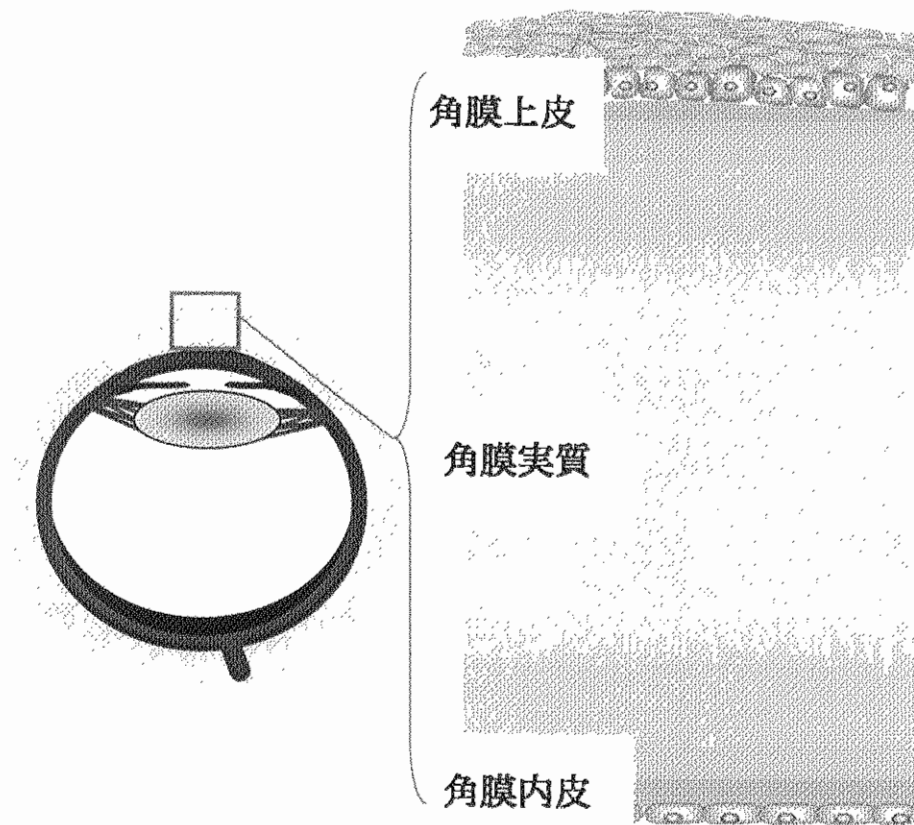


図1. 角膜の構造

角膜は角膜上皮、実質、内皮の3層構造からなっている。

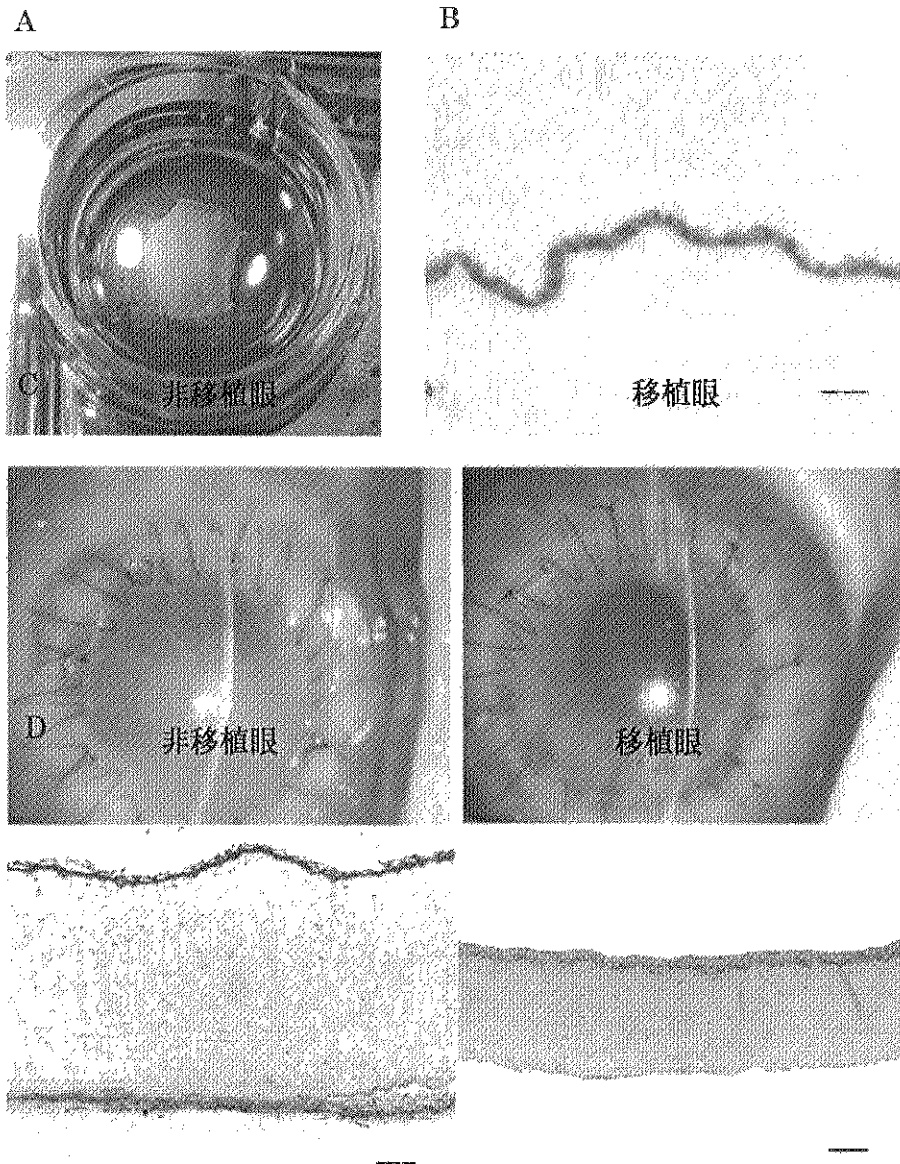


図2. ヒト培養角膜内皮細胞シートの作製および家兎眼への移植

A; 温度応答性培養皿上で培養した培養角膜内皮細胞シート

B; 培養角膜内皮細胞シートのHE染色像

C; 家兎水疱性角膜症モデルへの培養角膜内皮シートの移植 (左; 非移植眼、右; 移植眼)

D; 培養角膜内皮細胞シート移植後組織のHE染色像 (左; 非移植眼、右; 移植眼)

ヒト培養角膜内皮移植により、角膜厚および角膜の透明性が改善した。

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-

先端医療振興財団 先端医療センター 角膜再生医療研究グループ
東京大学大学院医学系研究科 角膜組織再生医療寄附講座 (アルプラスト株式会社)
山上 聡

1 はじめに

全層角膜移植術は、角膜の実質層と内皮細胞層をいっしょに交換する方法であり、角膜の混濁、形態異常などにより角膜を交換する必要がある場合の唯一の解決法であった。角膜上皮細胞層は、もともとホストの上皮幹細胞が再生して表面が修復されるため全層角膜移植術の治療対象ではない。欧米を含め我が国でも全層角膜移植術の約60%は、角膜内皮細胞数減少眼に対し行われている。角膜内皮細胞減少眼に対しては、術後の角膜形状に大きな変化を起し良好な視機能の期待しにくい全層角膜移植術ではなく、内皮層のみを交換する術式が望ましいと考えられる。また移植に用いられるドナー角膜は世界的な供給不足の状態にあり、手術が必要な患者には長い待機期間が必要となる。全層角膜移植術後の角膜形状の変化を改善する方法として、臨床の場で Descemet stripping and endothelial keratoplasty (DSEK) や Descemet stripping automated endothelial keratoplasty (DSAEK) と呼ばれる角膜実質層の後面と内皮細胞層だけを移植する技術が開発されてきている^{1, 2}。しかしこの方法は1つのドナー角膜から1つのグラフトを作ることができるだけであり、術後視力も必ずしも十分ではない。また術後の内皮細胞の減少率も高く、完成された術式とは考えにくい。こういった状況を背景に角膜内皮細胞の再生医療に強い期待が寄せられている。そこで角膜内皮再生の最先端と今後の発展性について各治療法の利点、欠点を含めて解説する。

2 培養ヒト角膜内皮細胞

かつてはヒト角膜内皮細胞の一次培養は困難とされていたが、予めウシ角膜内皮細胞を培養し、細胞成分を除去した基質の上にドナー角膜より採取されたヒト角膜内皮細胞を載せて培養することにより培養が可能となった³。培養細胞を細胞のソースとすることで1眼に1つのドナー角膜を必要とせず、1眼から数十から百眼以上の治療に使用可能、かつ通常稀にしか供給のない年齢の若いドナー角膜由来の細胞を使用できる点は大きな利点である。一方、培養細胞が眼の前房内でどのぐらいの寿命を持つかは現時点では不明である。さらにもともとのドナー角膜に起因する感染症に加えて、培養のためにウシ血清とウシ角膜内皮細胞由来の基質を必要とすることからウシに由来する感染症のリスクが加わり、かつ培養中に新たな感染を起こす危険性は完全には否定できない。今後はウシ由来の成分に依らない培養法へ発展していくと考えられるが、狂牛病の可能

性の全くないウシの安定供給という視点も考慮してよいのではとも考えられる。

3 培養ヒト角膜内皮前駆細胞移植

ヒト角膜内皮細胞の前駆細胞は、ドナー角膜内皮細胞から採取可能であった⁴。さらに培養ヒト角膜内皮細胞からも前駆細胞が採取可能であることが明らかとなり、この前駆細胞を眼の前房内へ注射により移植することで角膜の透明性を回復する方法を開発し、ウサギの水疱性角膜症モデル（角膜内皮細胞減少眼）で治療に成功した⁵。注射により眼の前房へ前駆細胞を入れるという方法は侵襲が少なく角膜の形状に影響を与えず理想的な治療法である。しかし現実的には十分な数の内皮細胞を供給するためかなりの数の前駆細胞を前房内へ入れることが必要であること、内皮面に付着しなかった細胞のその後の挙動が問題となるため、実現にはまだ相当な時間を要するものと考えられる。

この前駆細胞は直接治療に使用する方法以外にも以下に述べる細胞シートの細胞ソースとしても利用できる。すなわち前駆細胞由来の培養細胞は細胞形態がよく、高い質の培養ヒト角膜内皮細胞に分化するという利点を持つからである。一方、培養細胞をそのまま使用する場合に比べ、細胞の回収率が著しく低下する点が欠点となる。

4 培養ヒト角膜内皮細胞シート移植

（1）基質を用いるもの

これまでには、コラーゲン⁶や羊膜⁷を基質とした培養ヒト角膜内皮細胞シートをウサギに移植して、ウサギの角膜内皮細胞数減少眼の治療に成功した報告がある。これらの報告により、培養ヒト角膜内皮細胞をシートとして角膜裏面に貼り付けることで内皮細胞としての機能をもつことが明らかとなった。Ussing chamber を用いて角膜内皮細胞の Na+K+ATPase による輸送活性を評価したところ、ドナー角膜の 70-80%程度の機能を持っていた⁴。このように培養ヒト角膜内皮細胞を何らかの基質上で培養し移植することで細胞シートの取り扱いが容易となることは大きな長所であるが、眼内にこれまで留置されたことのない物質の長期安定性に関する評価には長い時間が必要であることが最大の欠点となる。

（2）基質を用いないもの

培養ヒト角膜内皮細胞単独で基質を用いない細胞シートにはこれまで温度応答性培養皿を用いたもの⁸とインサートカルチャーディッシュを用いたもの⁹が報告されている。この方法は眼内に持ちこむものが細胞のみであり優れた細胞シートである。しかし基質のない単層の細胞シートであるため、角膜内皮面への移植技術が極めて難しく既報でも全層角膜移植を行ってから内皮細胞シートを貼り付けるという術後の視機能という点では劣る方法をとって検討されている。何らかの方法で細胞だけを角膜内皮面に貼

り付けることができれば理想的な角膜内皮細胞移植術に近い方法ではあるが、現時点ではその移植方法が極めて難しいことが最大の欠点となっている。今後はこの技術的な問題をどのように解決していくかが鍵となると考えられる。

5 おわりに

角膜内皮細胞は眼の前房水に面し、背後はデスメ膜という内皮細胞の基底膜であるコラーゲンに裏打ちされて白血球が背後からは入りにくい環境にある。このとは内皮細胞のみを移植した場合は、ホスト側の抗原提示能を持つ細胞が内皮細胞を認識することを困難にしており、拒絶反応発生の可能性が極めて低いと考えられ、実際にマウスを用いた内皮移植モデルは拒絶反応が発生しなかった¹⁰。このことは全層角膜移植術後では副腎皮質ステロイドホルモン剤の点眼下で 10-30%の術後拒絶反応発生率が起きることに比べて非常に有利であることに加え、他の多くの組織、臓器の再生医療で術後拒絶反応の問題を解決できないために自己由来の組織、臓器を使用せざるをえず、結果として大量に移植材料を作製し移植するという産業化の道を阻んでいることとは基本的に大きく異なっている。このような観点からも培養ヒト角膜内皮細胞を用いた再生医療は、再生医療のモデルケースとして早期に実現させて行くべきテーマであろうと考えている。

References

1. Melles GR, Eggink FA, Lander F, Pels E, Rietveld FJ, Beekhuis WH, Binder PS. A surgical technique for posterior lamellar keratoplasty. *Cornea* 1998; 17: 618-626.
2. Gorovoy MS. Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea* 2006; 25: 886-889
3. Miyata K, Drake J, Osakabe Y, Hosokawa Y, Hwang D, Soya K, Oshika T, Amano S. Effect of donor age on morphologic variation of cultured human corneal endothelial cells. *Cornea*. 2001;20:59-63.
4. Yokoo S, Yamagami S, Yanagi Y, et al. Human corneal endothelium precursors isolated by sphere-forming assay. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:1626-1631.
5. Mimura T, Yokoo S, Araie M, Amano S, Yamagami S. Treatment of rabbit bullous keratopathy with precursors derived from cultured human corneal endothelium.

Invest Ophthalmol Vis Sci 2005; 46: 3637-3644.

6. Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, et al. Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. Invest Ophthalmol Vis Sci 2004; 45: 2992-2997.

7. Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, Connon CJ, Rigby H, Fullwood NJ, Kinoshita S. Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004;45:800-806.

8. Sumide T, Nishida K, Yamato M, Ide T, Hayashida Y, Watanabe K, Yang J, Kohno C, Kikuchi A, Maeda N, Watanabe H, Okano T, Tano Y. Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces. FASEB J. 2006;20:392-394.

9. Hitani K, Yokoo S, Honda N, Usui T, Yamagami S, Amano S. Transplantation of a sheet of human corneal endothelial cell in a rabbit model. Mol Vis. 2008;14:1-9.

10. Hayashi T, Yamagami S, Tanaka K et al. A mouse model of allogeneic corneal endothelial cell transplantation. Cornea in press

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

京都府立医科大学大学院視覚機能再生外科学

木下 茂

はじめに

角膜内皮細胞は、角膜の最内層に位置する1層の細胞であり、バリア機能とポンプ機能によって角膜の含水率を一定に保ち、角膜の透明性を維持する重要な機能を持つ。ヒト角膜内皮細胞は生体内における増殖能が極めて乏しく、外傷、内眼手術、ジストロフィーなどによって角膜内皮細胞が障害されると角膜内皮細胞密度の低下が生じる。正常では2500-3000個/mm²とされる角膜内皮細胞密度がおよそ400個/mm²以下に減少すると、角膜内皮機能不全によって角膜は膨潤して浮腫と混濁を生じる(図1)。角膜内皮機能不全により不可逆性の角膜浮腫を生じた病態を水疱性角膜症とよび、重症の視力障害の原因となる。社会の高齢化により水疱性角膜症による視覚障害者の数は年々増加傾向にあるが、中でも白内障手術あるいは閉塞隅角緑内障に対するレーザー虹彩切開術に起因する角膜内皮障害による水疱性角膜症患者の増加が大きな問題となっている。これら種々の原因による水疱性角膜症、およびその前段階である角膜内皮障害患者が、培養角膜内皮細胞を用いた角膜内皮治療の対象となる。

水疱性角膜症に対する現在の治療法

水疱性角膜症に対して行われている唯一の外科的治療法は、角膜組織の上皮、実質、内皮の3層構造をすべてドナーの角膜と置換する全層角膜移植術である。日本では年間約2500件の角膜移植が行われているが、国内アイバンクの提供角膜は慢性的に不足しており、約40%は米国を中心とする海外ドナー角膜に依存している(日本アイバンク協会および日本角膜学会調べ)。水疱性角膜症に対する角膜移植件数は年々増加しており、Japan Bullous Keratopathy Study Groupが1999-2001年に実施した全国調査では、角膜移植全体の24.2%が水疱性角膜症に対するものであった(表1)。¹ 水疱性角膜症に至る原因として白内障手術、レーザー虹彩切開術、緑内障手術、硝子体手術などの眼疾患治療に関連したものが7割を占めており、特にレーザー虹彩切開術に起因するものが多いことが日本における水疱性角膜症の特徴である(図2)。¹ 水疱性角膜症に対する全層角膜移植術では、移植後の数年間でドナーの角膜内皮細胞が急速に減少するために再び水疱性角膜症となり、再移植が必要になるケースがしばしばあることが問題とされる。

最近では、従来の全層角膜移植に変わる術式として、角膜内皮細胞と基底膜（デスメ膜）とともに、わずかな角膜実質組織を含む角膜内皮グラフトを移植する角膜内皮移植（DSEK: Descemet's stripping endothelial keratoplasty, DSAEK: Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty）が実用化された。^{2, 3} 角膜内皮移植は角膜内皮のパーツ移植であり、角膜全層を切開しないために角膜縫合が不要である。そのため眼球打撲などの外傷に強く、縫合糸に起因する角膜乱視や縫合糸感染を生じない。また ACAID (anterior chamber-associated immune deviation) が成立する免疫寛容部位である前房に手術侵襲による破壊を生じないために、拒絶反応発生率が低くなると予測される。

角膜内皮移植は、手術器具を含めた手術手技がほぼ完成しており、水疱性角膜症に対する新しい外科的治療として今後は急速に広がっていくものと推測される。しかし現在の角膜移植術は、手術手技に関わらず1眼の治療に1眼のドナー角膜が必要であり、日本における慢性的な提供角膜不足を解消することはできない。また、増殖能に乏しい *in vivo* 角膜内皮細胞をそのまま移植する角膜内皮移植では、全層角膜移植と同様に、移植後の角膜内皮細胞密度低下が懸念される。DSEK あるいは DSAEK の術後1年における角膜内皮細胞数の減少は34-39%と報告されており、⁴ これらの問題を解決する再生医学的治療法の開発が必要である。

培養角膜内皮移植の必要性

ヒト角膜内皮細胞は生体内では非常に増殖能の低い細胞であるが、培養基質や培養液を工夫することによってヒト角膜内皮細胞を *in vitro* で培養し、増殖させることが可能になった。⁵⁻⁷ 現在、日本を中心とするいくつかの施設において、生体外で培養した角膜内皮細胞をシートあるいは細胞懸濁液として移植する培養角膜内皮移植の開発が行われており、家兎⁸⁻⁹ あるいはサル¹⁰ を用いた動物実験によってその有用性が示されている。

培養角膜内皮移植のメリットとしては、限られたドナー角膜からティッシュエンジニアリングの手法を用いることにより培養角膜内皮細胞を大量に作成することが可能であり、提供角膜不足による問題を解決する一つの有用な方法となる。また生体外で培養した角膜内皮細胞を用いることによって、高密度の角膜内皮細胞シートを移植することができ、移植後長期間にわたって角膜の透明性を維持することができると考えられる。霊長類を用いた研究では、眼内に移植された培養角膜内皮細胞は、生体内においても移植後しばらくの間は増殖能を持ち続ける可能性があることが示されており、¹¹ 培養角膜内皮移植は移植後の内皮細胞密度低下の問題を解決する新しい治療法になる可能性がある。さらに免疫学的なメリットとして、

前房内の環境を破壊することなく角膜内皮細胞のみを移植する手技を用いることにより、拒絶反応のリスクを減らすことができる可能性がある。このように、これまでの基礎研究において、培養角膜内皮移植には従来の全層角膜移植あるいは角膜内皮移植(DSAEK など)に勝る様々なメリットがあることが示されている。

国内および海外での予測患者数

現在の日本の角膜移植件数は年間約 2500 件であり、待機患者数は 5000 人にのぼる。角膜移植患者の約 25%が水疱性角膜症であることから、年間 500 人以上の患者が培養角膜内皮移植の適応となる。現在の全層角膜移植では手術適応にならない初期の水疱性角膜症に対しても、本治療法は有効であると推測されるため、国内では年間 1000 人以上の患者が本治療法の適応になると推測される。

一方米国では、年間に約 32,000 件の角膜移植が行われており、そのうちの約 40%が白内障手術あるいはフックス角膜ジストロフィーによる水疱性角膜症である。^{12, 13} これらのデータから、米国においては年間およそ 12,800 眼が培養角膜内皮移植の適応になると考えられる。

実用化への期待

社会の高齢化に伴って加齢に伴う眼疾患患者が増加しており、白内障や緑内障、網膜硝子体疾患に対する治療技術がめざましい進歩を遂げている。先端技術を用いた治療によって視機能の回復を得る患者がいる一方で、内眼手術の晩期合併症としての水疱性角膜症患者は増加している。生体内で増殖しにくいヒト角膜内皮細胞を培養する技術が確立されたことは画期的であり、すでに実用化されている DSAEK などの角膜内皮移植の手技を応用することによって、培養角膜内皮移植は近い将来に実現可能な治療法となる。臨床応用を目指した培養角膜内皮移植の開発は、日本の研究チームは世界的にもトップレベルの技術を有しており、数年以内に実用化されるべき課題であると考えられる。

*In vivo*角膜内皮細胞は増殖出来ない

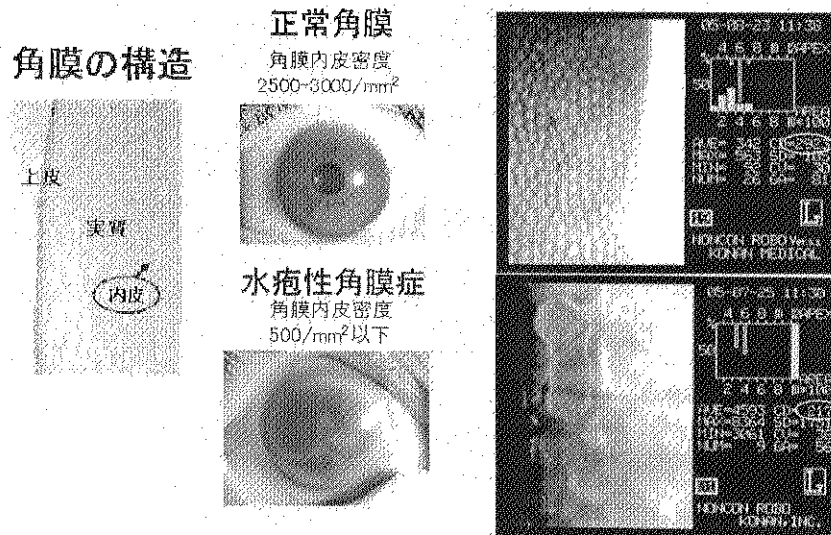


図1 角膜の構造と水疱性角膜症

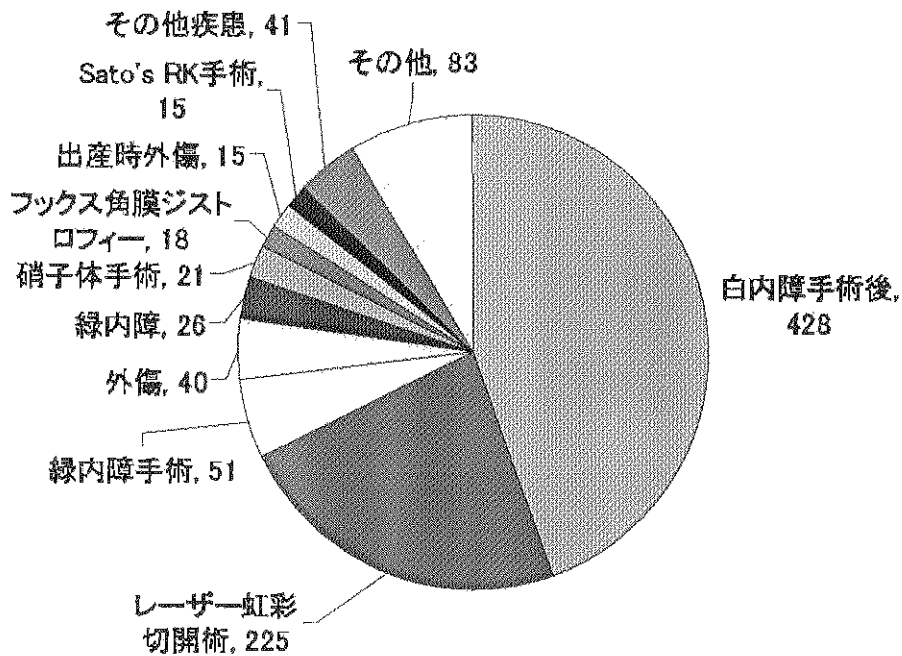


図2 日本における水疱性角膜症 (963例) の原因 (文献1より改変、引用)

	1999	2000	2001	合計
日本における角膜移植件数	2487	2650	2642	7779
参加施設の角膜移植件数	1254	1330	1388	3972
参加施設におけるBK	283	296	384	963
移植に占めるBKの割合(%)	22.6	22.6	27.7	24.2

BK: bullous keratopathy, 水疱性角膜症

表1 日本における角膜移植件数と水疱性角膜症（文献1より改変、引用）

文献

1. Shimazaki J, Amano S, Uno T, Maeda N, Yokoi N. National survey on bullous keratopathy in Japan. *Cornea* 2007;26:274-278.
2. Price FW, Jr., Price MO. Descemet's stripping with endothelial keratoplasty in 50 eyes: a refractive neutral corneal transplant. *J Refract Surg* 2005;21:339-345.
3. Gorovoy MS. Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea* 2006;25:886-889.
4. Terry MA, Chen ES, Shamie N, Hoar KL, Friend DJ. Endothelial Cell Loss after Descemet's Stripping Endothelial Keratoplasty in a Large Prospective Series. *Ophthalmology* 2007 Dec 26 [Epub ahead of print].
5. Zhu C, Joyce NC. Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1743-1751.
6. Engelmann K, Bohnke M, Friedl P. Isolation and long-term cultivation of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29:1656-1662.
7. Miyata K, Drake J, Osakabe Y, et al. Effect of donor age on morphologic variation of cultured human corneal endothelial cells. *Cornea* 2001;20:59-63.
8. Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, et al. Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:2992-2997.
9. Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, et al. Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:800-806.
10. Sumide T, Nishida K, Yamato M, et al. Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces. *Faseb J* 2006;20:392-394.
11. Koizumi N, Sakamoto Y, Okumura N, et al. Cultivated corneal endothelial cell sheet transplantation in a primate model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:4519-4526.
12. Darlington JK, Adrean SD, Schwab IR. Trends of penetrating keratoplasty in the United States from 1980 to 2004. *Ophthalmology* 2006;113:2171-2175.
13. Ghosheh FR, Cremona FA, Rapuano CJ, et al. Trends in penetrating keratoplasty in

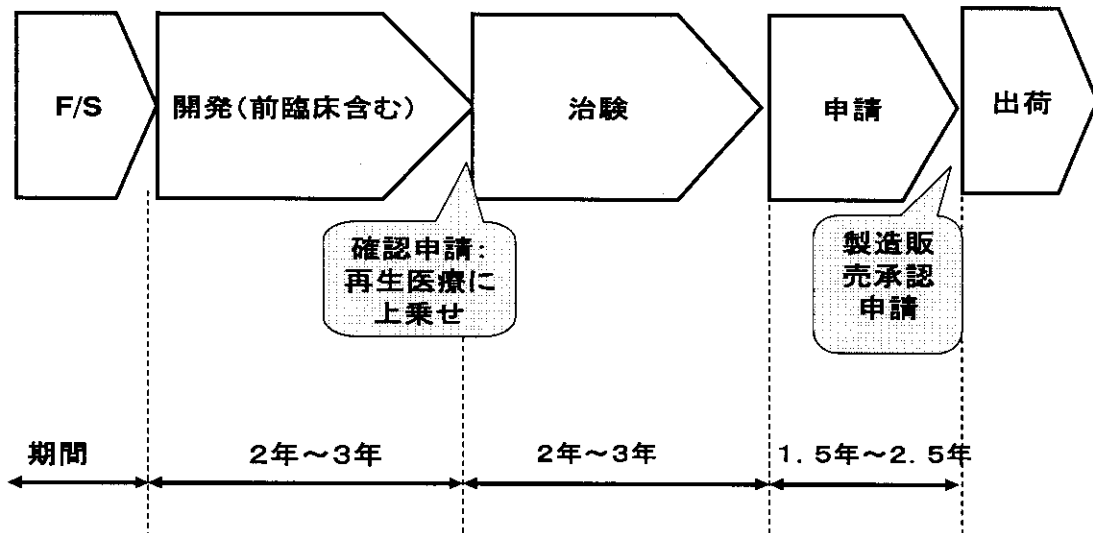
the United States 1980–2005. *Int Ophthalmol* 2007.

3-1. 次世代評価指標（再生）について

テルモ株式会社

新たな医療機器・医薬品等の医療関連製品の開発は、医療の現場におけるニーズを取り込み、医療関連製品の概念の確立、裏づけとなる安全性・有効性試験の実施、必要な場合は臨床試験も実施し、製品開発の中でこのように実施された種々の試験のデータをもとに作成された薬事申請資料の審査をうけて、製造販売承認申請が与えられるといった開発プロセス（図1）によりおこなわれている。

図1. 医療機器開発のステップ



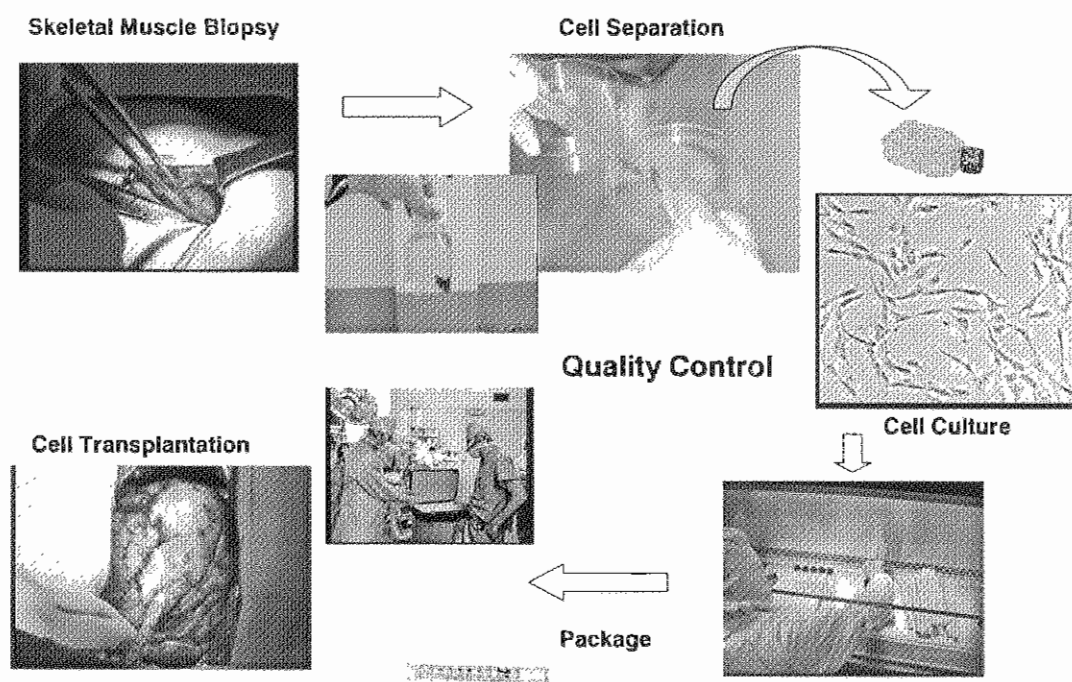
また、新たな薬事法のもとでは、このようなデータ蓄積とあわせて、製造方法を確立しておく必要がある。このように、開発を開始し承認を取得するまでには多くのデータが必要とされるが、再生医療の場合は、このような製造販売承認申請に先立つ治験届前に確認申請が必要とされ、ここでは品質及び安全性に関する内容が審査されることとなっている。いままで、この確認申請で提出すべき内容が通知に記載されている範囲では具体的な要求事項が明確ではなく、このことが日本における再生医療が進まない原因といわれていた。

次世代医療機器評価指標作成事業は、新たな医療機器の開発でどのような前臨床（非臨床）試験が必要とされるか、また治験においてはどのレベルの臨床試験が行われるか、このような開発から臨床の各段階における要求事項があらかじめガイドラインとして明示されることによって、開発が進むことが期待される。制度制定の初年度から、埋め込み補助人工心臓の開発WGに参加したが、埋め込み補助人工心臓と再生医療（心筋再生）とでは、その製品ステージに多少の違いがあり、補助人工心臓では日本国内の承認実績はまだ少ないものの、海外における承認実績とし

てはかなりの品種がありまた使用実績もあるが、一方心筋再生は世界的に見ても未だに臨床段階であり、承認された製品はない。同じ次世代医療機器であっても、製品のステージの違いでガイドラインとしての特性は異なってくる。開発初期である再生医療製品については、標準的な評価手法はまだ定まっておらず、したがって再生医療製品については項目として掲げるべき事項は、特に安全性・有効性については多くの項目を挙げて、そのうちから各開発メーカーの考え方によって評価すべき手法を選択すべき製品群と考えられる。

弊社においても、米国企業からの技術導入ではあるが骨格筋芽細胞移植による心筋再生の検討を行っており、弊社の自己骨格筋芽細胞を用いた再生医療について図示するとともに、確認申請等においてガイドラインの必要性を感じた内容について、以下に述べる。

図. 2 自家骨格筋芽細胞の処理プロセス



患者の正常な筋肉組織を採取し、この組織より分離した骨格筋芽細胞を培養して増殖させ、規格に定めた細胞数の懸濁液に調整して、患者の梗塞病変の周囲に注射することで、心機能の回復を期待するといった治療である。通常の自己細胞移植においては、例えば培養表皮は皮膚から採取した表皮細胞をシート状に加工して同じ皮膚に移植するが、骨格筋芽細胞による心筋再生は、筋肉組織より採取した骨格筋芽細胞を心筋に移植するといった異所性の移植となる。これは、病的状態の心臓より心筋細胞を採取することのリスクよりは、正常筋肉細胞より採取した骨格筋芽細胞を心筋に移植するリスクが少ないとの判断より実施されている治療である。

自己細胞ではあるが、異所性移植をおこなうためには、どのようなことを安全性試験として実

施していればその治療が安全と判断できるか種々検討をおこなった。技術導入先では移植した骨格筋芽細胞が心筋の拍動に同調しない結果として、重篤な不整脈が生じないか、といった課題については、動物モデルによりそのリスクのないことが明らかとされていたし、さらには細胞移植による治療の有効性評価として移植細胞の移植部位への滞留の確認が実施されていた。これらの実験結果に加えて、確認申請段階では異所性移植による安全性への考察として、異所性骨化の可能性否定および局所発ガンの可能性否定について指摘された。自己細胞の異所性移植による腫瘍発生については、どこまで確認すべきか、またその具体的な方法についてもどの様におこなうべきか、明確な指標はなかったが、『次世代医療機器評価技術作成事業』（再生医療：細胞シート）の平成17年度報告には、確認すべき事項とし『細胞シートにかかる動物実験に関する指針』には以下の項目が掲げられていた。

- ・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並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並びに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べきである。

「腫瘍原性に関する検討」

細胞シートに内包される細胞集団由来の腫瘍発生に関する検討は、組織学的に S/N 比による検討、あるいは染色体数ないしは FISH 法による c-myc の過剰増加の検討により行うものとする。

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。（心筋表面への移植が望ましいが、皮下移植でも代用可能とする。なお、観察期間は1年とする。）

このように、新たな評価手法に関するガイドラインが明確化されることはありがたいことであるが、実際には免疫不全マウスを用いて長期（1年間）の移植実験を行うことには、個体の維持、免疫不全状態の維持、免疫不全による自然発生的な事象の背景データの不備など多くの課題があり、記載内容のとおりの実験の実施にはいたっていない。

次世代医療機器評価指標作成事業は、企業の開発推進に役立つ政策として産官学共同で進めている事業であるが、対象医療機器の成熟度により作成されるガイドラインの内容も、標準的な評価手法まで記載できるものと、まだ項目として提案は出来るものの、具体的な評価手法としては手探り段階のものまでであると考えられる。基本は、このようなガイドラインを作成する段階から企業もできる範囲で参加し、ガイドライン作成の議論を学識経験者及び審査担当を交えておこなうことにより、相互に理解も進み、企業にとっても、どのような視点で申請資料をとり揃えるべきかの考え方をまとめることできることになると考えられる。

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

はじめに：

株式会社セルシードは、日本発の「細胞シート工学」に基づく再生医療の実用化を目指し、様々なパイプライン（角膜、心筋パッチ、食道、歯根膜など）の研究開発を進めている。現在、日本においてこれらの開発品はいずれも安全性確認申請前であるが、これまで再生角膜上皮用細胞シートの開発戦略及び試験計画の立案、医薬品医療機器総合機構生物系審査部との事前面談、対面助言、照会・回答等のやり取りの中から、再生医療製品を開発する上での様々な課題が明らかになってきている。今般、医薬発 1314 号通知の改訂が行われるにあたり、まず自己由来の細胞・組織由来製品について新たな指針案が提出された。この指針改訂案を見ると、細胞のソースが自己のものである自家移植製品に限定されたことにより、製品規格などの考え方がより柔軟になり、実現しやすい内容に一步近づいたものになったことは、再生医療の製品化を目指す企業にとっては歓迎すべきものであると認識している。しかし、内容は充分具体的とは言えず、企業が製品化を目指して迅速に開発を進めるための道しるべとしては総合機構と具体例を用いて相談せざるを得なくなり、開発期間に影響を与えると言える。再生医療は新しい医療であり、目指す製品が多様であることから、これら全般を扱う指針としては、画一的にならずかつなかなか具体的な基準を示しにくいと言うのが現実であろう。それを補完する意味で、貴 WG など限定された対象に対して具体的な評価指標を策定されることを期待している。

さらなる再生医療製品の開発の迅速化及び審査の円滑化へ寄与することを願い、ベンチャー企業の立場からこれまで再生角膜上皮用細胞シートの開発時に直面した困難について言及するとともに、今後の審査体制や規制環境の改善、評価指標の策定に関する要望を率直に述べさせていただく。

開発時に直面したいくつかの困難：

様々な開発パイプラインの中で、角膜上皮幹細胞疲弊症を対象疾患として開発している再生角膜上皮製品は、大阪大学の西田幸二博士（当時、現 東北大学教授）との共同研究に基づいて製品開発を進めてきた。安全性確認申請を目指した開発に際し直面していた大きな課題は、製品規格及び製造工程の妥当性検証の方法、開発用材料の入手、動物実験の妥当性、などがあった。

- ・最終製品規格及び工程の妥当性検証

再生角膜上皮シートを企業が製品とするためには、当然、製品規格が必要である。感染性因子の否定、製品の細胞自体が望ましくない形質変化を起こさないこと、再現性高く製品が作製できる工程であるといったリスクの低減と効能上のベネフィットを発揮する製品であることを示すためにも製品規格は必要である。しかし、規格として採用した項目と規格値の妥当性を明確に検証するには培養試験データと臨床試験データの両方が不可欠である。

海外の既存製品の導入ではなく日本発の先端技術を元にした製品開発であること、再生医療製品という前例のない分野の開発品であること、医薬品・医療機器開発の歴史の浅いベンチャー企業であることなどから、細胞シートの規格の候補となる有効性・安全性指標（品質管理項目）の選定、規格や工程の妥当性を検証するための試験方法の確立は、暗中模索の状態であった。

既存の臨床研究結果や関連の学術論文等の知見から、発現タンパク質や細胞形態、細胞純度といった、最終製品の規格の候補となる指標を選出することはできるが、その指標が製品規格として採用可能かどうか、項目が規格として妥当であるか、規格値をどのように定めるか、規格値が妥当であるかについて、治験実施前に検証することは非常に困難である。

安全性の指標については、例えば角膜、口腔内といった外界に暴露されている組織を原材料として採用する場合には、工程中で無菌化を達成し、最終製品の段階で無菌及びエンドトキシンが基準値以下であることを示す必要がある。しかしながら、エンドトキシンによる汚染のないことを示すための品質管理試験の実施のためには、安全域をどのように設定すべきかに苦慮した。

製品規格が流動的であると工程管理方法も定まりきらない。まずは暫定的な規格を設定し、治験結果から規格及び規格値の幅の妥当性を検証できることが指針に明記されていなかったこともあり、どの程度厳密に各規格値、品質管理項目を設定すべきか、また、設定した規格及び品質管理項目が妥当であるか、工程設計や品質管理項目の検討は非常に困難で時間がかかったところである。

・開発用材料の入手

工程や各種品質管理方法の妥当性検証には、治験品と同等の細胞シートを用いての試験が望ましいが、健常なヒトの眼球表面から細胞を採取する行為は倫理的に難しく、ボランティアも得がたい。最適な試料を用いての試験は困難であったことから、輸入角膜を試験試料として各種の試験を試みることとなったが、総合機構からは、実際の製品の材料となる患者さんからの材料と輸入角膜との同等性を示すようにとの指摘を受けた。

一般的に自家培養製品を開発するためには、十分な量の材料となるヒトの組織や細胞が必要である。角膜については、米国で移植に適さないものを合法的に入手することが可能であったが、他のほとんどの組織については、現在、企業が入手する手立てはほと

んどないといってよい。この問題を解決しない限り、企業が、正しく品質規格を定めた再生医療製品を開発していくことは極めて困難である。

・動物実験

非臨床安全性試験のうち、動物実験の位置づけが不明瞭であり、また実施が困難であった。

手法の観点からはまず、疾患モデル動物の作製の問題がある。弊社の角膜上皮再生用細胞シートの場合、外科的に角膜輪部を含む角膜上皮を取り除き、人工的に角膜輪部上皮疲弊症を作るといった動物モデルが考えられる。しかし、スティーブンス・ジョンソン症候群といった内因性疾患による病態を忠実に反映したモデルではない。

また、治験相当品の品質、安全性、有効性を検証するために、ヒト由来細胞シートをモデル動物に移植すれば、免疫抑制剤の使用や免疫不全動物などを採用しなければ細胞シートの生着は維持できず、ヒトでの病態と治癒機序を反映した試験系にならない。自家細胞シート移植治療の有効性を検証するために、動物由来の自家細胞シート移植をした場合にも、動物でのデータをどの程度ヒトの治癒機序に当てはめることができるのかといった、モデル動物選択の妥当性を含めた試験自体の妥当性を示すことが困難である。さらに、自己由来製品の場合、原材料自体の性質に個人差があるためバラツキがあり、どれくらいの動物数で動物実験を実施すれば妥当な結果が得られるのかについても判断が難しい。

手法自体の難しさがある上に、動物実験でヒト自己細胞シートの免疫原性や毒性等、有効性・安全性について、何をどこまで明らかにすることが可能であるかが曖昧なままである。GLP 施設での動物実験委託は非常に高額な費用がかかることもあり、動物実験で示すことができる有効性・安全性の要件が曖昧で、明確な試験の目的と試験方法(実施計画書)が立たない状態では実施は非常に困難である。

・薬事申請

こういった困難や疑問を解決するためには、開発当初のコンセプトの段階から医薬品医療機器総合機構と率直に相談できる環境が必要である。しかし、当時は、個別の問題を相談するためにも申請書案全体をまず作成する必要があった。部分を相談するためには、全体を作成する必要があり、全体を作成するには、部分が明確でなければならない。両者は堂々巡りすることになり、時間を浪費することとなった。

今後の審査体制や規制環境の改善、評価指標の策定に関する要望：

- ・ 有効性及び安全性に関わる最低限超えるべき基準の具体的な項目・数値の提示
再生医療を製品化するためには、超えるべき明確な基準が必要である。基準が明確で

あればあるほど、開発期間や開発費の見積もりが正確にでき、企業が事業として参入すべきかどうか判断が可能となる。この意味で貴 WG やその他の WG が具体的な再生医療品について具体的な検討項目や超えるべき数値を示していただけるよう要望する。もし再生医療製品が多様なために具体的な数値を示すことが困難であれば、開発の初期、コンセプトの段階から薬事申請に関する相談を受け付け、開発の初期から産官学が協力し合って、いち早く新しい医療を待ち望んでいる患者の期待に応えるべきである。

- ・ 再生医療の現実にあった基準の設定

薬事申請にかかわる検査・試験方法の多くは、有効期限が1年程度ある安定な医薬品や医療機器に関して定められたものである。しかし、再生医療製品、特に自家移植製品は、投与するまでの有効期限が短く、これまでの薬局方で定められた検査・試験方法では、現実にそぐわないものがいくつもある。例えば、薬局方で定められた無菌試験は、最終的な結果を得るためには、2週間必要であり、患者への投与までに間に合わない。結果が出る頃にはすでに患者体内でその結論が出ており、臨床上の利益を生まない可能性がある。このような検査・試験方法に対して、積極的に実情に合った代替案を提示し、また、新しい標準的検査・試験方法を承認していただきたい。

- ・ 必要最小限の項目の設定

生命科学の進歩に対応して、製品の安全性や有効性に関して役に立つかもしれない知識・検査項目は、急速に増大した。しかし、それらすべてを満たすべき製品基準・規格として採用すると、その検査費用は、製造に関わるコストの何十倍にも上る可能性がある。患者の安全性、利益を確保するためにどれが必須であり、どれは参考データにすべきかを見極めないと、それらはすべて製品コストに含まれ、限られた人々のみを受けられる高額で特殊な医療となる恐れがある。誰もが受けられる医療とするために、必要最小限の管理項目を明確にしていきたい。

- ・ 規制環境の国際化

欧州、米国、韓国など再生医療の実用化が進んでいる地域の規制環境との調和及び整合性を実現していただきたい。例えば、欧州では科学的安全性・試験の妥当性は、試験実施者が当局の中央審査を受け、安全性・試験の妥当性・倫理性を中心に、治験実施責任医師から倫理委員会へ申請を行い、倫理委員会は国内倫理委員会を代表としての審査を行う。この際に双方へ提出する申請書一式は同一書類であり、記述すべき内容も統一されている。このことによって治験施設ごとに異なる書式や基準で申請書類を準備する必要がなくなり、申請者からすると時間的負担が軽減される。日本発の技術を日本及び海外で実用化する場合、海外の技術を導入する場合、いずれにおいても、日本と海外とで規制環境の調和と整合性がとれていることが開発側企業の大きな助けとなる。

・審査期間の明確化

安全性確認申請から始まり、製品を販売するまでの各審査承認手続きにおいて、Q&Aを含めた審査期間に一定の目安を定めていただきたい。再生医療という先端分野で製品化を目指す企業は、弊社を含めベンチャー企業が少なくない。審査期間が明確になること、もしくはマイルストーンのように審査過程における現状が把握できることは、時間的・資金的負担が予測できることにつながり、再生医療の製品化に挑戦する開発側企業にとって非常に重要な意味を持つ。

おわりに：

再生医療という最先端分野の製品をより迅速に患者に提供するために、審査・評価の基準が明確になることは開発の大きな助けとなる。再生医療WGにおいては、安全性・有効性の必要十分な評価指標について、規制を補完する形で具体化していただけるものと期待する。さらに、現在は、例えば無菌検査の試験方法一つをとっても、製造終了から患者への適用までの時間的制限から薬局方等既存の方法をそのまま適用することが難しい場合がある。改訂1314号における新しい指針においては、開発企業側が柔軟に品質管理方法を採択できることが謳われているが、新規の方法を採用すれば、方法自体の妥当性検証が必須である。一企業が品質管理に必要な評価方法を一つ一つ創り上げその妥当性を検証していくことは困難であることから、産官学の協力によって、より実用的な評価方法が標準的な検査方法として早期に採択される道すじを作っていただきたい。ここに示した弊社の意見および要望等が新たな審査・評価の検討に寄与できることを願う。

3-3. 実用化促進のための審査指標に対する要望等

アルブラスト株式会社

再生医療が夢の治療方法と唱われはじめてからかなりの時間が経過した。これまで多数の大学病院や企業で各種の再生医療の治療方法や製品開発が進められて来たが、未だ再生医療が実用化されたとは言えない状況にある。この間に、海外においては実用化が着実に進んでいる。本邦における再生医療の実用化の遅れには種々の要因があると考えられるが、再生医療材料の製品化を目指している当社の経験から、以下に規制や制度に関する要望等を記載した。これらの要望が、日本における再生医療材料の早期の製品化と、本分野で世界をリードする国になるための一助になることを期待する。

また、実例として、弊社が製造販売承認取得を目指している培養角膜上皮細胞シートに関する知見及び製品化の必要性についても記載した。

1.0 現行制度に関する問題点及び改善要望等

(1.) 行政当局による審査方法

近年、細胞・組織を利用した医薬品等に関する技術開発は世界各国の多数の研究機関において盛んに行われ、急速な技術革新が進んでいる領域である。しかしながら、現行の製造販売承認申請等の承認取得には長期間を要するため、製品上市に必要な承認審査の期間中にも日進月歩で研究が進められているため、製品の上市時点もしくは開発途中で次世代の技術が開発されてしまう。

また、その場合、次世代の技術に変更あるいは新規申請するにも同様の長期の期間を要する。世界中での急速な技術革新や技術開発が進む再生医療の世界では、この傾向は特に顕著であり、実用化を目指す再生医療企業ではどの段階の製品で製品化を目指すのかを判断することが非常に困難である。より良い製品を迅速に普及させ、早期に患者に提供するために製品改良に関わる審査方法を工夫することでこれらの技術革新を迅速に取り入れることが可能になると考えられる。

(2.) 臨床研究結果の活用

本邦では再生医療に関して、多くの大学附属病院で臨床研究が盛んに実施されているが、事業化は進んでいない。これは実用化のための承認申請に大学附属病院等で実施された臨床研究結果を用いることが困難なことに起因してきた。そのため、大学で開発された新しい技術の実用化を目指す企業は各種の非臨床試験や臨床試験を企業自身が最初から行うことになる。つまり、製品化を行う段階で製造方法の確立からやり直す必要性が生じている。現在は「幹細胞を用いた臨床研究に関するガイドライン」が施行され徐々に体制整備がされつつあるものの、これらの整備には多大な費用と GCP, GLP 等の専門知識が必要となる。例えば一案として臨床研究を実施する大学に医薬品等の開発経験のある人材を配備し迅速な承認取得を可能にする体制整備を行い、臨床研究段階から製品化を見据えた製造方法・品質管理方法の確立や安全性・有効性の検証などについてデータを蓄積することが有効かも知れない。これにより承認審査に用いることができるデータ取得が可能となると考える。また、米国のように大学等の機関での臨床研究に対して臨床試験開始申請 (IND) 制度をとることも選択肢のひとつかも知れない。

(3.) 審査制度の改善

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構(総合機構)が設立され、医薬品等の各種承認申請

や相談が総合機構で行われるようになり、総合機構が審査機関としての責務を負うこととなった。審査と承認を分離する現行制度には長所もあるが、一方で審査がガイドラインや過去の事例に従った画一的なものとなり、細胞を使った医療機器のように申請品目ごとの特性に見合った柔軟性のある審査を迅速に行うには、申請者と直接のやりとりを行う総合機構あるいは審査担当者に一定の権限を与え、最終的に審査を含めた承認のすべての責任を厚生労働省が負うことが有効と考える。

(4.) 希少疾病用医薬品等指定制度の活用等

現在、各機関・企業で開発が進められている再生医療材料は、そのほとんどが重度障害患者を適応患者とし、適応患者数も非常に限られている。適応疾患と患者数は現行制度の希少疾病用医薬品等指定申請の要件を満たすものが多い。再生医療製品の審査期間の短縮及び開発費の負担軽減のために、この制度は有効である。希少疾病用医薬品等指定制度を有効に活用するためには、可能な限り開発早期の段階での指定が必要である。希少疾病用医薬品等指定申請及び審査内容を明確にして、指定申請を行い易くすることも重要である。

また、開発費の軽減化策として、有償治験制度の導入も検討に値すると考える。

(5.) 適応疾患患者の意見の反映

再生医療はヒトの細胞や組織を利用するために未知のリスクを完全に払拭することは困難であり、リスク・ベネフィットバランスが評価審査の指標のひとつとなっている。ところが、現行の審査制度ではリスクとベネフィットを評価する時、患者の意見を反映させる方法もなく、要望書として申請書に添付する程度である。そのうえ、添付された患者の要望書の評価方法は不明確である。再生医療のような限定された患者に適應される医薬品等、特に数多くの臨床研究が実施されている品目においては、実際に使用した患者の意見は有用であり、実際の患者の声が承認審査に反映されるような方策は双方に有益と考える。例えば患者団体などからヒヤリングの機会を持つことなどは検討する余地があると考えられる。

(6.) 開発途中での簡易相談の設置等

現在、総合機構や厚生労働省においては、各種の相談システムが開設されているが、そのほとんどは承認申請段階のものである。そこで再生医療のような新しい領域の製品の実用化を目指す企業に対しては、開発初期を含めた開発段階での相談システムを開設することが有用である。製造販売承認までの審査期間が予想できず、開発スケジュールが立てにくい現状は企業戦略の立案を困難にしている。審査側の細やかな相談、指導により正確なスケジュールを立てることが出来れば、開発経費も含めた開発計画をより正確に立案することが可能となる。

反対に、治験に関する相談のように多種多様な相談が設定され、いずれの相談に該当するか判断が難しく、事前相談によって確認する事態も生じている。このようなことは相談者、被相談者のいずれにとっても相談案件の解決を困難にしており、改善が必要であると考えられる。

(7.) 助成金制度の改善

近年、再生医療分野に多額の助成金が投入され、研究開発や実用化のための支援が行われている。これらの助成金は三省(厚生労働省、文部科学省及び経済産業省)の所管がほとんどで、省庁あるいは省庁所管独立行政法人によって個別に運営されている。再生医療の開発・実用化促進という目的のための助成金は基礎研究、製剤化研究、非臨床試験及び臨床治験の全領域に効果的に支援される必要がある。しかしながら、現状は個々の省庁が別々に助成金の支援先を決定している上、支援する開発プロセスにも偏りがあり、臨床治験に対する助成金はほとんどないのが現状である。

助成金が効果的に活用されることを目指して「三省連携」が提案されており、今こそ、三

省が連携して有効かつ将来性のある助成金支援を行うようにすべきと考える。その際に、現状の助成金の運用方法の問題点も改善の必要がある。例えば、助成金の監査方法の統一化、長期間の試験研究に係る支援方法(特に、年度をまたがる試験研究)等、各開発段階に対する有機的な助成支援体制の確立が必要と考える。現状の支援策では中途半端な支援になりかねない。

2.0 角膜再生のための細胞シートに関して

培養角膜上皮細胞シートはヒト角膜とヒト羊膜を用いて培養・製造される同種(allogeneic)由来の移植材料であり、京都府立医科大学 眼科学教室において研究開発され、30 症例を超える臨床研究実績をもつ移植材料である。京都府立医科大学眼科学教室における培養角膜上皮細胞シートの研究開発から臨床研究に至る経緯は「再生医学による重症角膜疾患の新規治療法開発への戦略的研究」と題して、木下らによって詳細に報告されている¹⁾。また、本培養角膜上皮細胞シートを用いて、国のミレニアム・プロジェクトとして、統一プロトコールによる角膜上皮幹細胞疲弊症を対象とした眼表面再建のための臨床研究が、2003 年 9 月から 2 年間に渡って実施された。本プロジェクトは京都府立医科大学眼科学教室で確立された培養方法により作製された培養角膜上皮細胞シートを用いて、京都府立医科大学付属病院眼科、愛媛大学医学部付属病院眼科、東京歯科大学市川総合病院眼科の 3 施設で行われたものである。

弊社では京都府立医科大学からの技術移管に始まり、製造・品質管理方法の確立、非臨床試験の実施等の試験研究を 5 年余りの期間をかけ、培養角膜上皮細胞シートの実用化に向けた努力を行い、今春には確認申請ができる段階まで来た。培養角膜上皮細胞シートの主なヒト由来原料は角膜と羊膜であるが、角膜については本邦においても数多くのアイバンクが存在し、各種レギュレーションも定められ、多数の移植実績がある。本稿では特に本邦における情報が少ない羊膜について、世界各国の現状を含めて、ガイドラインを紹介する。

2.1 羊膜の安全性に関して

ヒト羊膜は、血管新生抑制作用、抗炎症作用等の特性を有するとされ、特に眼科領域では本邦を含め世界各国で臨床使用されている。本邦では難治性眼疾患に対するヒト羊膜移植術が先進医療技術として認定されている。患者に適用するヒト羊膜は非自己の組織であるため、患者への感染防止対策が必要である。そこで、患者の安全性確保のために遵守すべき基本要領として、世界保健機構(World Health Organization)の指針を紹介し、弊社の知見を基にヒト羊膜を用いた製品の安全性確保対策について記載する。さらに、ヒト羊膜を原料とする海外製品を紹介し、続いて各国から報告されている眼科領域におけるヒト羊膜の臨床症例を紹介する。

(1.) ヒト羊膜の安全性確保対策

移植用ヒト細胞・組織は、生きたヒトもしくは死亡者から採取された後、洗浄・乾燥・保存等の最低限の処理が施され、多くの場合、ウイルスの不活化/除去工程を経ることなく患者に移植される。また、ヒト由来細胞・組織は貴重であるため、その需要に応じては採取国のみならず世界各国に供給される。従って、細胞・組織の提供者を起源とする感染や作業(製造)工程における病原体の迷入による感染が、地球規模で拡散する可能性がある。そこで、WHO は移植治療による感染の拡散を防止し、尚且つ患者に対して有用なヒト細胞・組織を提供するために遵守すべき基本要領として、ヒト組織等を取り扱う各国の組織バンクの専門家と 2004 年 11 月 29 日~12 月 1 日に協議し、指針(Aide-Memoire on Access to Safe and Effective Cells and Tissues for Transplantation)を作成した^{2, 3, 4)}。なお、当該指針では、凍結骨・腱、凍結乾燥骨、皮膚、羊膜、凍結心臓弁、角膜、骨髄幹細胞、臍帯血が対象とされた。ヒト羊膜は生きたドナーから採取され、冷蔵保存される。そして、洗浄や適切な大きさに裁断及び保存等の処理が施され、以下の形態で出荷される。

- ① 処理されることなく冷蔵保存されたヒト羊膜
- ② ヒト羊膜に含まれる細胞を生きた状態で凍結保存されたヒト羊膜(Cryopreserved)

- ③ グリセロール溶液で凍結保存されたヒト羊膜(生細胞を必要としない羊膜)
- ④ 乾燥されたヒト羊膜

乾燥羊膜については、最終滅菌されるものとされないものが存在する²⁾。現在、ヒト羊膜は日本の組織バンクでは取り扱われていないものの、既に米国、英国、フランス、ドイツ、イタリア、ノルウエー、スロバキア、チュニジア、イラン、インド、スリランカ、タイ、中国、韓国、アルジェニア、ブラジル等の諸外国の組織バンクで取り扱われており⁴⁾、組織バンクから出荷されたヒト羊膜は特に眼科領域の臨床に適用されている。例えば、23ヶ国からなるヨーロッパアイバンク協会の報告では、2001年から2003年の間に眼表面の手術材料として年間1500ものヒト羊膜が出荷されており、年々その需要が増加している(表-1)⁵⁾。WHOで作成された指針にヒト羊膜も対象とされた背景には、ヨーロッパ諸国で行われた治療実績、2001年11月に移植材料として米国で承認を受けた製品の事例、あるいは日本をはじめとする諸外国でヒト羊膜を用いた多くの臨床症例があること、及びヒト羊膜の使用症例数の増加があり、移植用組織としての安全性と品質確保のためには世界規模で調和させる必要があったことが示唆される。

表-1. ヨーロッパアイバンク協会報告-ヒト羊膜を眼表面の治療に使用した実績⁵⁾

	2001年	2002年	2003年
調査に回答したバンク数	67	82	83
調査に回答したバンクが属する国数	21	21	20
ヒト羊膜を出荷したバンク数	31	37	47
バンクから出荷されたヒト羊膜数	1,965	1,504	2,559

表-2にWHOの指針の概要を示した。安全で品質が確保された有用なヒト細胞・組織を患者に移植するためには、細胞・組織の採取から、製造、使用まで一貫した方策をとる必要性が指摘されている。なお、当該指針は、移植材料としてのヒト細胞・組織の基準を既に制定している米国、カナダ、欧州連合等の基準をベースとしており、基本的概念や方法を参照することができる。

表-2. 世界保健機構 - 移植用ヒト細胞・組織に対する指針の概要^{2, 3)}
(*ヒト羊膜特有の指針を示す)

<p>1. 提供者の適格性判断</p> <p><問診・カルテの閲覧等により以下の者を除外する></p> <ul style="list-style-type: none"> ・ HIV, HBV, HCV 感染者もしくはその疑いを有する者 ・ クロイツフェルト・ヤコブ病(変異型を含む)とその疑いを有する者 ・ 現に細菌, 真菌, ウイルスもしくは寄生虫の感染症を有する者 ・ 最近, 重篤な感染リスクに暴露された者(生ワクチン投与者を含む) ・ 悪性腫瘍の既往を有し, 組織提供者として医学的に不適格と判断された者 ・ 認知症, 原因不明の神経系疾患 ・ 採取組織に損傷を有する場合 ・ 異種移植を受けた者 ・ 原因不明の病歴を有する者 ・ 原因不明の死(細胞・組織提供者が死亡者である場合) ・ ドナーの出生地や渡航歴から風土病(HTLV-I, マラリア, シャーガス病等)に対し高リスクで, かつ, 別途検査等により, そのリスクがコントロールできないもの(但し, 角膜等の無血管性組織に対しては問わない) ・ 組織の品質や安全性を損なうような妊娠合併症*

<血清学的検査>

- ・少なくとも、HIV-1/2 抗体、HCV 抗体、HBs 抗原、梅毒の検査を行う。
- ・風土病に罹患したリスクを有する者に対しては、別途検査を行う。
- ・検査のための採血は、細胞・組織提供の前後 7 日以内に行う。
- ・死亡者からの採血は、死後 24 時間以内とする。
- ・高感度の方法(核酸増幅検査)により検査を行わない場合は以下に従うこと
→提供者が生存者であり、採取した細胞・組織が長期保存可能な場合は、試験を行った期間がウィンドウ・ピリオドに該当する可能性を考慮し、180 日後までに再試験を行う。

2. コンタミネーション防止

- ・細菌等による汚染の防止と組織の品質保持のため、細胞・組織の保存は定められた期限内に適切な温度で実施すること。
- ・適切な汚染除去もしくは滅菌手段が不可能な場合は、無菌的操作を行い、細胞・組織に対しては無菌試験により菌の発育を認めないことを確認すること。
- ・汚染除去工程は、バリデートされた方法により行うこと。また、汚染除去工程の後の操作は無菌的に行うこと。細胞・組織に対しては無菌試験により菌の発育を認めないことを確認すること。
- ・最終滅菌工程は、バリデートされた方法であること。
- ・基本的に他の提供者から採取された細胞・組織と混合しないこと。

3. 組織採取と工程

- ・各工程は SOP として文書化され、最終製品の品質と有効性を確認できるバリデートされた品質管理システムに従って行われねばならない。
- ・羊膜は帝王切開後に無菌操作により胎盤から分離する（最終製品で滅菌を行う場合は、自然分娩もしくは帝王切開後に清潔操作により分離する）*。
- ・羊膜を凍結保存(Cryopreserved)する場合は、抗凍結剤の添加が分かるように記録する。必要な細胞生存率が維持できるバリデートされた方法で凍結する*。
- ・羊膜をグリセロール溶液に保存する場合は、グリセロールの添加が分かるように記録する。組織片の機能が維持できるバリデートされた方法で凍結する*。
- ・羊膜を乾燥もしくは凍結乾燥する場合は、無菌的に管理された環境下で残存水分が 6%未満となるように乾燥する*。
- ・羊膜を最終滅菌する場合は、インジケーターにより確認する。放射線照射量を確認する*。

4. 保存, 包装, 表示

- ・保存・運搬時に外部環境から感染を防止し、品質を損なうことのないように包装する。
- ・提供者に付与された識別番号によってトレーサビリティを可能とする。
- ・表示ラベル(もしくは説明書)には以下を表示する。
 - ・ヒト細胞・組織名とバンク名称(出荷元)、保存・取扱注意事項
 - ・ヒト細胞・組織の大きさ、量
 - ・過敏性物質、防腐剤の使用の有無またはその濃度
 - ・抗生物質と濃度もしくは実施した滅菌法
 - ・滅菌工程を経ていない場合、汚染除去工程もしくは無菌試験結果の明示
 - ・細胞・組織の臨床適用に関する有害事象の報告、使用期限の明示
- ・羊膜の保存期間*
 - ・グリセロール溶液中で保存した場合：組織採取から 2 年まで
 - ・凍結保存した場合：組織採取から 5 年まで
 - ・上記の保存をしない場合：14 日まで
 - ・保存は、バリデートされた適切な温度で行う。

6. 品質管理システム

- ・細胞・組織調達、保存、作業、供給を含む運営組織は、個々の役割と責任を明確にした組織体制とすること。
- ・医学的側面及び品質管理システムの責任者を確定すること。また、適格性を有し、教育を受けた者を確保すること。
- ・移植のための細胞・組織の採取からすべての工程について SOP を作成すること。
- ・完全で正確な全ての工程記録を保管すること(器具、試薬のロット番号を含む)。
- ・出荷可能な製品とそうでないものを明らかにし、安全に隔離すること。

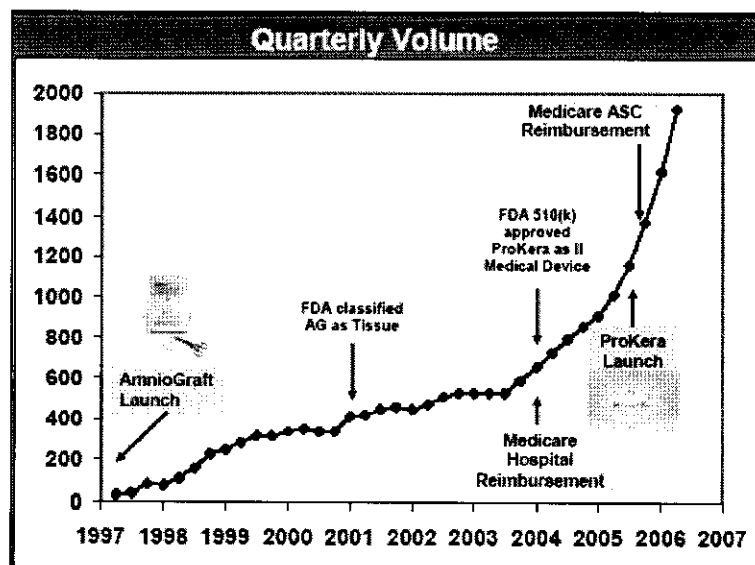
7. 評価

- ・設備機器は使用前にその適格性を確認すること。
- ・各工程はバリデーション(妥当性の確認)もしくはベリフィケーション(検証)を行う。
- ・重要工程と保存温度の監視及び記録を行うこと。
- ・品質管理システムが適切に機能していることを内部監査により確認すること。
- ・可能な限り、外部監査を行って法令遵守されていることを検証すること。
- ・逸脱と苦情は記録し、調査を行うこと。

なお、本邦ではヒト羊膜に関する基準や指針は存在しない。そのため、製品原料にヒト細胞・組織を使用する場合には生物由来原料基準(2005年3月31日改正、平成17年厚生労働省告示177号)や厚生労働省の各種通知に従って、安全性と品質を確保する必要がある。

(2.) ヒト羊膜を原料とする製品

米国では眼疾患を有する患者のために、ヒト羊膜を原料とする二種類の製品が BIO-TISSUE 社より製造販売されている。AMNIOGRAFTRは、採取したヒト羊膜に対して、洗浄・裁断・凍結保存等の最小限の処理が行われ、FDAのGTP(Good Tissue Practices)に適合する⁶⁾製品である。2006年の同社の報告によると、これまでに当該製品を用いて13,995件の治療が行われた。その対象患者は、翼状片(38%)、角膜移植の失敗症例(19%)、角膜上皮欠損・潰瘍(14%)を含む眼表面疾患とされ、その需要は増加している。一方、PROKERATMは、ソフトコンタクトレンズとAMNIOGRAFTRを組み合わせた製品であり、FDA 510(k)クラスII医療機器に分類されている⁷⁾。いずれの製品も放射線照射等によるウイルス不活化/除去工程は行われていない。これらの製品に使用されているヒト羊膜はアメリカ組織バンク協会が認定する施設において、妊婦から採取されたヒト羊膜である。米国においては、ヒト羊膜は、角膜組織、骨、皮膚等と同様に移植用組織として、米国連邦法の組織提供者の適格性基準等を遵守する必要がある^{8~13)}。従って、ヒト羊膜の提供者に対しては、これらの基準に従い問診・検査(血清学的検査を含む)が行われ、適格性が判断された者から採取されたヒト羊膜が当該製品の原料となっている。BIO-TISSUE社のこれら二製品の販売数量は下図¹⁴⁾に示されているように、年々増加している。



(3.) 眼科領域における羊膜利用の実際

(a.) 背景

羊膜の移植材料としての利用が初めて報告されたのは、1910年に遡る¹⁵⁾。それ以来、羊膜は熱傷、外科手術におけるドレッシング材をはじめとして、耳鼻科・泌尿器科・整形外科での形成術等において広く利用されてきた¹⁶⁾。眼科領域での羊膜の使用に関しては1940年に最初の報告がなされたものの¹⁷⁾、眼科領域での羊膜の処理・使用法・有効性が確立されず、以来50年間にわたり、その利用は普及しなかった。しかし、1995年にTsengらが実験モデルにおいてウサギ眼に対するヒト羊膜の移植実験を報告した¹⁸⁾のをきっかけに、眼科領域における利用価値と使用手技が確立されて一躍脚光を浴びることとなり、以来十数年の間に急速にその利用が普及した。

(b.) 羊膜の特性

羊膜は以下のような様々な特性を持つことが報告され、特に眼科領域での有用性が注目されて盛んに研究・臨床応用が進められている。

① 上皮化の促進作用^{19, 20)}

眼の表面は、主に透明性の高い角膜上皮と、その周辺を取り囲む結膜上皮によって構成されている。角膜上皮は外界からの光情報を網膜へ伝達する経路の最初の入り口であることから、角膜上皮が透明で平滑であることは、正常な視力を維持する上で大変重要である。また結膜上皮には、粘液を産生する機能を持つ杯細胞と呼ばれる細胞が多数存在し、眼の表面の潤滑性を保つことによって、眼表面の正常な状態の維持に寄与している。羊膜は、これらの上皮細胞の接着と伸展を促すことによって、上皮細胞の増殖の足場としての機能を担う。また様々な成長因子によって上皮細胞の分化、増殖を促進し、アポトーシスを抑制することが報告されている。このような特性を持つことから、羊膜移植を用いることによってより速やかに、平滑性と透明性を保った眼表面の修復が可能となる。

② 瘢痕組織の形成抑制作用^{21, 22)}

瘢痕組織は炎症の治癒の過程で形成される組織で、主に炎症細胞や線維芽細胞によって形成される。眼の表面が瘢痕組織で覆われると透明性が著しく損なわれるため、瘢痕組織の形成を抑制することは視力を維持する上で重要である。瘢痕組織の形成において重要な役割を担うのが線維芽細胞であるが、羊膜はこの線維芽細胞にとって重要な成長因子であるTGF- β の産生と刺激の伝達を抑制する。また、本来透明性の高い組織である角膜上皮や、その源である角膜上皮幹細胞が炎症に伴って透明性の低い組織へ置き換えられることを抑制する。以上のような羊膜の性質を利用することで、瘢痕組織によって眼表面の透明性が失われるのを防ぐことが可能となり、視力の維持や改善を目指す上で、より有効性の高い治療が可能となる。

③ 炎症・血管新生の抑制^{23, 24)}

羊膜の抗炎症作用については様々な報告が存在する。その機序に関しては未だ不明な点も存在するものの、中でも炎症を惹起するサイトカインであるIL-1 α /IL-1 β の抑制作用や種々の炎症性サイトカインを抑制する因子を有することなどが主なメカニズムとして報告されている。また、エンドスタチンやトロンボスポンジン-1等が発現していることにより、血管新生を抑制する機能を持つことが報告されている。以上のことから、羊膜を用いることによって眼表面の炎症の沈静化が得られ、また眼の表面への血管の侵入を防ぐことにより、眼の表面の透明性を維持することが可能となる。

(c.) 羊膜の採取と保存方法

標準的な羊膜の採取および保存は以下のように行われる²⁵⁾。羊膜はコンタミネーションの可能性を避けるため、自然分娩ではなく帝王切開時に無菌的に採取される。採取した羊膜は洗浄後に絨毛膜を剥離し、通常4×4 cm程度の大きさに切り分けられたのち、

適当な溶液中で-80℃にて凍結保存される。凍結保存された羊膜は凍結処理をしていない羊膜と同等の効力を有することや凍結保存が羊膜の特性や治療における有効性に影響を与えないことが確認されている²⁶⁾。従って、保存、輸送、取り扱いの容易さなどから、現在では凍結保存羊膜が普及し、広く利用されている。

(d.) 眼科臨床における羊膜使用実績

現在までに眼科領域では、以下のような疾患に対して羊膜移植を適用した臨床報告が存在する²⁷⁾。いずれも未だ開発途上の治療法であるため、有効性は報告によってそれぞれ異なるものの、既存の治療法では対応できない症例に対する新しい治療法として期待され、様々な研究が進められている。

- ・ 結膜表面再建術
 - 翼状片，結膜腫瘍の切除，眼球癒着の剥離，化学外傷，癢痕性角結膜炎など
- ・ 角膜表面再建術
 - 遷延性上皮欠損，難治性角膜潰瘍，部分的角膜上皮幹細胞疲弊症，完全角膜上皮幹細胞疲弊症(角膜輪部移植との組み合わせ)，重症水疱性角膜症，帯状角膜症
- ・ 角膜上皮幹細胞あるいは結膜幹細胞の培養基材として

英国では早くから羊膜の眼疾患治療に対する有用性が認識され、羊膜バンクが整備されて稼働しており、羊膜の臨床利用が広く普及している。そうした中で、羊膜を用いて治療が行われた233例に関する報告では、疾患によって有効性は異なるものの、概して54.1% (22.2-62.5%) の治療有効性が得られたことが報告されている²⁸⁾。また同様にイタリアでも羊膜バンクが整備されており、2001年までの2年間で、90の病院へ、463件の分与が行われたことが報告されている²⁹⁾。なおこれらの報告を含めて、滅菌処理を行っていない凍結保存羊膜を使用した例はこれまでに多数報告されているが、羊膜を原因とする感染症伝播の事例は現在まで報告されておらず、現在運用されている感染症防止策が有効に機能していることが示されている。以上のように、羊膜の有用性は広く認識され、世界各国で普及が進められている。今後、本邦においても羊膜バンクが整備され、安全で均質な羊膜が提供されることによって、地域や医療機関に寄らず、患者に適切な治療機会が提供されるようになると思われる。

2.2 羊膜を用いた培養角膜上皮細胞シートの有用性に関して

羊膜を用いた角膜上皮細胞シートの臨床適用例として、国際誌に掲載されている主要論文として表-3に示した3報を、代表的な例として紹介する。

表-3. 培養角膜上皮細胞シートの臨床適用例に関する報告

主な研究者	症例数	対象疾患	細胞シート構成	治療効果	合併症
Daya SM (英国) (Ref. 30)	10例 (10眼)	SJS (3) 化学外傷 (2) 熱傷 (1) その他 (4)	角膜輪部細胞 ナイロンシート 羊膜	角膜上皮の修復: 80% (8/10) 治療奏効: 70% (7/10) 視力改善: 40% (4/10)	角膜の細菌感染症 (1)
Shimazaki. J (日本) (Ref. 31)	13例 (13眼)	OCP (3) SJS (3) 化学外傷 (2) その他 (5)	角膜輪部細胞 羊膜	短期 角膜上皮の修復: 62% (8/13) 長期 角膜上皮の修復: 46% (6/13)	血管の再進入 (2) 角膜穿孔 (4) 感染性角膜炎 (2)
Koizumi N (日本) (Ref. 32)	11例 (13眼)	OCP (2) SJS (5) 化学外傷 (3)	角膜輪部細胞 羊膜	角膜上皮の修復: 100% (13/13) 視力改善: 77% (10/13)	眼瞼内反 (1) 限局性細菌感染 (1)

されるまでの10日ないし2箇月の間、上皮が欠損した状態が持続するため、感染症のリスクが高い状態が続く。また上皮化に時間がかかることに伴って血管や結膜の進入が生じ、平滑で透明性の高い上皮の再生が難しい。

③ 羊膜による炎症・瘢痕形成・血管新生抑制効果

培養角膜上皮細胞シートには、羊膜が持つ上皮細胞の定着・増殖・分化を促進する性質を利用して、角膜上皮細胞の培養基材として用いられるものがある。その培養角膜上皮細胞シートは移植時に羊膜面が眼表面に貼り付けられ、羊膜上に培養された上皮細胞層が外側になる。従って、上皮細胞層による上皮の補填機能に加え、前項の(b.)に記述したような、羊膜が持つ炎症・瘢痕形成・血管新生を抑制する効果も同時に得ることができる。

以上に示したように、羊膜を培養基質に用いた培養角膜上皮細胞シートは羊膜と角膜輪部細胞の特性を生かした細胞シートであり、失明の危機に曝されている角膜上皮幹細胞疲弊症の患者にとって救いとなる治療方法であり、薬剤や他の外科的治療では代替できない治療法となる。これこそが再生医療の真価を示すものであると判断する。それ故、一日でも早い実用化が患者会からも熱望されている。

ヒト由来の羊膜や角膜の安全性については、世界各国での組織採取規定や使用実績から担保されていると判断される。

参考文献等

- 1) 木下 茂 他：再生医学による重症角膜疾患の新規治療法開発への戦略的研究，最新医学，62 (1)：132 - 180，2007/12/19
- 2) World Health Organization (HTP/EHT/CPR/T02)：Aide-Memoire on Key Safety Requirements for Essential Minimally Processed Human Cells and Tissues for Transplantation.
- 3) Aide-Memoire on Access to Safe and Effective Cells and Tissues for Transplantation (AM_HCCTASE_07_06.doc)
- 4) Report of the First Global Consultation on Safety and Quality Requirements for Cells and Tissues for Transplantation, Ottawa, November 2004.
- 5) ヨーロッパアイバンク協会報告書
http://www.europeaneyebanks.org/public/_tpl/visual_lib.cfm?attachId=59
- 6) AMNIOGRAFTR取扱説明書
- 7) PROKERA™取扱説明書
- 8) 21 CFR Part 1270 - Human Tissue Intended for Transplantation
- 9) 21 CFR Part 1271-Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products
- 10) Manual of Standard Operating Procedures and Policies Regulatory-compliance Procedures for Handling Adverse Reaction Reports Related to "361" Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products (HCT/Ps) SOPP8508 Version#1 (Feb. 28, 2005)
- 11) Guidance for Industry: Eligibility Determination for Donors of Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products (HCT/Ps) (August , 2007)
- 12) Guidance for Industry: Preventive Measures to Reduce the Possible Risk of Transmission of Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) and Variant Creutzfeldt-Jakob Disease (vCJD) by Human cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products (HCT/Ps) (Jun , 2002)
- 13) Current Good Tissue Practice for Manufactures of Human Cellular and Tissue-Based Products; Inspection and Enforcement: Proposed Rule. January 2001
- 14) Scheffer C.G. Tseng, MD, PhD Amniotic Membrane Transplantation for Ocular Surface Reconstruction.: 6th Annual Somatic Cell Therapy Symposium 2006
- 15) Davis JW. Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. Johns Hopkins Med J. 15: 307, 1910
- 16) Fernandes M. et al. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. Cornea. 24; 6, 2005

- 17) de Roethth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch Ophthalmol.* 23: 522-525, 1940
- 18) Kim JC, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea.* 14: 473-484, 1995
- 19) Tseng SCG, Prabhasawat P, Lee SH. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol.* 124: 765-774, 1997
- 20) Khodadoust AA, Silverstein AM, Kenyon KR, et al. Adhesion of regenerating corneal epithelium and the role of basement membrane. *Am J Ophthalmol.* 65: 339-348, 1968
- 21) Choi TH, Tseng SCG. in vivo and in vitro demonstration of epithelial cell-induced myofibroblast differentiation of keratocytes and an inhibitory effect by amniotic membrane. *Cornea.* 20: 197-204, 2001
- 22) Tseng SC, Li DQ, Ma X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol.* 179: 325-335, 1999
- 23) Hao Y, Ma DKH, Hwang DG, et al. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea.* 19: 348-352, 2000
- 24) Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, et al. Suppression of interleukin-1a and interleukin-1b in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol.* 85: 444-449, 2001
- 25) Kim JC, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea.* 14: 473-484, 1995
- 26) Adds PJ, et al. Amniotic membrane grafts, "fresh" or frozen? A clinical and in vivo comparison. *Br J Ophthalmol* 85: 905-907, 2001
- 27) Burman S, et al. Ophthalmic applications of preserved human amniotic membrane: A review of current indications. *Cell and tissue banking,* 5: 161-175, 2004
- 28) Saw VPJ et al. Amniotic membrane transplantation for ocular disease: a review of the first 233 cases from the UK user group. *Br J Ophthalmol* 91: 1042-1047, 2007
- 29) RAMA P. Further evaluation of amniotic membrane banking for transplantation in ocular surface diseases. *Cell and tissue banking,* 2: 155-163, 2001
- 30) Daya SM, et al. Outcomes and DNA analysis of ex vivo expanded stem cell allograft for ocular surface reconstruction. *Ophthalmology,* 112: 470-477, 2005
- 31) Shimazaki J, et al. Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology,* 109: 1285-1290, 2002
- 32) Koizumi N, et al. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology,* 108: 1569-1574, 2001

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
信頼性保証部兼薬事部 黒田 享

角膜の再生といっても、現在の再生医療技術によって再生できる角膜組織は角膜上皮、角膜実質、角膜内皮を複合的に構築したものではなく、個別の組織の再生にとどまっているのが現状である。さらに、製品化が間近に近づいている角膜再生組織は角膜上皮のみである。ここでは、培養角膜上皮に関する評価指標に関して開発企業の立場からの意見をまとめた。

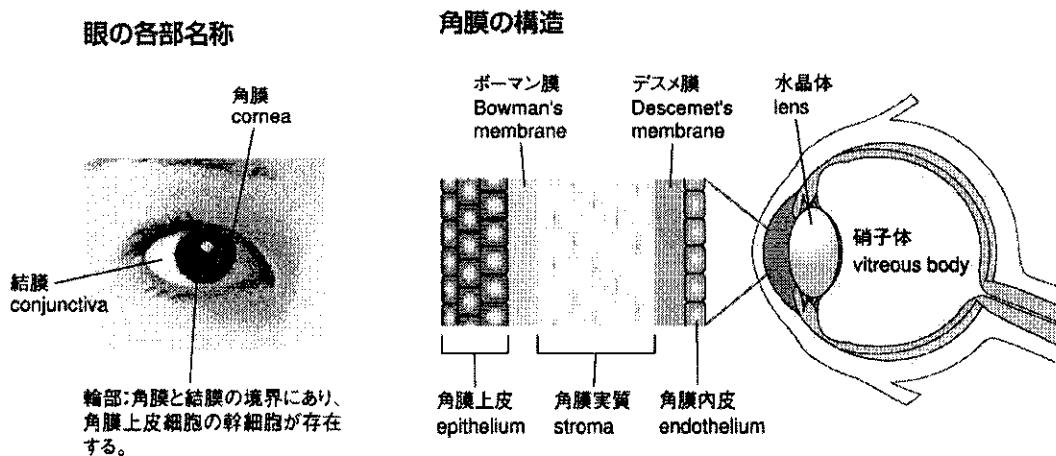


図1 眼の各部名称・角膜の構造

1. 培養角膜上皮シートの必要性

あらためてここで培養角膜上皮シートの必要性に関して述べさせていただきたい。

化学傷や熱傷により眼表面の輪部にある角膜上皮幹細胞を失うと、周囲の結膜細胞によって角膜の表面が覆われる。しかし、この異常な治癒では、角膜への血管侵入と慢性的な炎症を伴う癒痕となり、最終的に角膜が不透明になり視力が失われる。

輪部の角膜上皮幹細胞が消失している疾患 (limbal deficiency、癒痕性角結膜上皮疾患、角膜上皮幹細胞疲弊症と呼ばれる。) に対する、根治を目指した唯一の治療法は、自家輪部移植である。すなわち、患者自身の健常眼から輪部の一部を採取し、患眼に移植する治療法である。しかし自家輪部移植は、健常眼からの広範な輪部採取 (輪部の 30~40%) が必要であり、健常眼への侵襲性が高い。

一方、障害を受けた角膜実質を治すには、アイバンクからの同種角膜移植が唯一の治療法である。しかし、輪部の角膜上皮幹細胞が失われている患者では、角膜移植を行うと、角膜細胞ではなく結膜細胞が角膜を覆い、予後不良となる。

以上より、輪部の角膜上皮幹細胞が失われている患者には、安全、有効、かつ効果が長期間継続する治療法は存在せず、培養角膜上皮シートの製品化が望まれている。

2. 培養角膜上皮シートの品質管理上の評価指標

「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について（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）」（平成12年12月26日付医薬発1314号）がベースとなるものとするが、これを前提に培養角膜上皮シートとして特有な評価指標と考えられるものを中心にまとめた。

なお、現在当該通知の改正が進められており、改正案においては、その記載内容がより明確化させるとともに「自己由来製品」と「同種由来製品」に分割されると聞いている。

2.1 製造工程・最終製品の評価指標

2.1.1 原物質（角膜組織）

培養角膜上皮シートの原物質（角膜組織）の入手・受け入れに際しては、特に培養角膜上皮シートに特有なものではない。その品質は、原物質採取後の保存・輸送状況に影響されるものとする。凍結あるいは体温以上での保存は、細胞に障害を与えるおそれがあり、雑菌の繁殖等を抑制することも考慮し、低温保存が必要かもしれない。その品質を評価する指標としては、少なくとも「保存・輸送状況の確認（温度管理等）」「目視による外観検査（組織、保存液）」等が必要ではないかと考える。

2.1.2 製造工程

培養角膜上皮シートの製造（培養）工程中の評価指標としては、特に培養角膜上皮シートに特有なものではないが、少なくとも「角膜上皮細胞の形態観察」「角膜上皮細胞の継代時の生細胞率」等のような細胞としての品質・機能を確保するための評価が必要ではないかと考える。

2.1.3 最終製品

培養角膜上皮シートとしての最終製品の評価指標は有効性（性能）評価指標および安全性評価指標に2つに大別できるものと考え、以下に分けて記載する。

2.1.3.1 有効性（性能）評価指標

特に培養角膜上皮シートに特有なものではないが、少なくとも「角膜上皮細胞の生細胞数及び生細胞密度」「角膜上皮細胞の形態観察」「角膜上皮細胞の純度」が必要であると考える。

これらに加え、製品の形態・使用目的によるものではあるが、シートとしてある一定の力学的強度を必要とするのであれば「力学的適合性」を評価する必要があると考える。

培養角膜上皮シートに特有なものとして、「培養角膜上皮シートの効能試験」の設定が今後の課題となっている。培養角膜上皮細胞においては、角膜上皮幹細胞が有効であるという考え方が一般的になってきているものの、幹細胞の存在を測定する手法は確立されていない。p63が推定上のマーカーとして可能性が示唆されているが、測定法のバ

リレーションを含め、その評価法は確立されていないのが現状である。開発企業は「効能試験」の設定を目指し、幹細胞の評価手法の開発を進めているところである。

2.1.3.2 安全性評価指標

特に培養角膜上皮シートに特有なものではないが、少なくとも「角膜上皮細胞の形態観察」「角膜上皮細胞の純度」「無菌試験」「マイコプラズマ否定試験」「エンドトキシン試験」が必要であると考ええる。

これらに加え、培養中にウシ血清、抗生物質およびフィーダー細胞等のように、残留することによって安全性上重大な影響が及ぼす可能性が想定される添加成分に関しては、それらの残留量に関して評価を行う「製造工程由来不純物試験」が必要であると考ええる。

また、角膜上皮細胞が産生する生理活性物質のうち、性能に関与するものではなく、その存在量によって患者に安全性上重大な影響を及ぼす可能性が想定される場合は、その許容量限度試験を設定する必要があると考ええるが、現時点では明らかに想定される生理活性物質は不明である。

3. 非臨床安全性に関する評価指標

製品の特性および適用方法をふまえ選択すべきものであるが、医薬発 1314 号においてもも定められているように、培養角膜上皮シートにおいても、培養期間を超えて培養した細胞が目的外の形質転換を起こしていないこと示す必要があると考ええる。これは、核型分析等の手法を用いて評価することが可能であると考ええる。

さらに、同様の細胞を用いて造腫瘍性がないことを示す必要があると考ええる。これは、軟寒天コロニー形成試験やヌードマウスを用いた移植試験等の手法を用いて評価することが可能であると考ええる。

また、必要に応じ角膜上皮細胞が産生する生理活性物質について、患者に対する安全性上影響を与える可能性について考察するために、それらの産生量を評価する必要があると考ええる。

4. 効力または性能を裏付ける動物実験に関する評価指標

ここでは培養角膜上皮シートの効力または性能を裏付ける評価としての動物実験に関して述べることとし、実験動物を用いた安全性評価に関しては「3. 非臨床安全性に関する評価指標」の項に記載した。

動物実験の試験デザインの設計においては、それが技術的に可能であり、さらに科学的に合理的である範囲で考えるべきとされている。

培養角膜上皮シートの評価を行う場合、適当なモデル動物としてウサギが用いられる。眼科関連製品の評価において、一般的に利用される動物であるが、ウサギの角膜上皮幹細胞疲弊症モデルは存在しない。そこで、事前に外科的処置を行い、角膜上皮幹細胞疲弊症モデルを作っているのが現状である。これには下記のような問題がある。

- ・ ウサギ由来の培養角膜上皮細胞とヒト由来の培養角膜上皮細胞ではウサギ培養角膜上皮細胞の方が分化しやすいなどの細胞生物学的特性に違いがある。
- ・ ウサギモデルにおいては、創部を安静に保つことが難しい。これらは、動物実験特有の要因に加え、投薬など術後の創管理方法に対する困難さがある。

これらを解決し、技術的に可能であり、さらに科学的に合理的である動物実験の評価手法を確立することも今後の課題である。

5. 臨床試験に関する評価指標

臨床試験においては、培養角膜上皮シートの有効性および安全性を実際の患者を対象に評価することになる。

その有効性の主要評価項目としては、「角膜上皮の再建の程度」を評価すべきと考える。角膜上皮の再建の程度の評価手法としては、臨床所見、細隙灯顕微鏡検査およびフルオレセイン染色等の結果を総合的に判断し、グレーディングするようなことになると考えるが、一般的に知られた評価指標はなく、その確立が必要である。その他にも、有効性の評価項目として、「細胞診断検査（インプレッションサイトロジー）」「視力」「自覚症状」等が考えられる。

安全性の評価項目としては、特に培養角膜上皮シートに特有なものではないが、「2.1.3.2 安全性評価指標」および「3. 非臨床安全性に関する評価指標」の項をふまえ、形質転換および造腫瘍性の観点から「腫瘍性病変の発現」、ウシ血清、抗生物質およびフィーダー細胞等の残留の観点から「アレルギー症状の発現」、ウシ血清およびフィーダー細胞等の動物由来成分の残留の観点から「感染症の発現」、等を評価すべきと考える。