

平成25年度 再生医療等産業化促進事業
(膝関節軟骨損傷、自己軟骨細胞加工製品)
報告書

平成26年3月

委託元 経済産業省

委託先 公益財団法人先端医療振興財団

目次

1.	事業内容と実施項目	1
2.	各業務内容の詳細と結果及び考察	2
(1)	治験薬 GMP に対応した試験物の製造・品質・衛生管理体制の整備	2
(2)	再生医療製品の同等性・同質性評価に必要な試験物の特性解析データ取得	4
(3)	輸送用容器の評価	5
(4)	軟骨組織修復・再生の定量的評価	6
(5)	産業化に向けた消耗品類の安定的入手のための取組	8
(6)	有識者会議	8
3.	まとめと今後の課題	9

1. 事業内容と実施項目

本事業は、公益財団法人先端医療振興財団（先端財団）と神戸大学医学部附属病院の共同で医師主導治験実施中の自己軟骨細胞加工製品（IK-01）に関して、先端財団の先端医療センターCPCを治験機器製造施設として治験を実施する過程を経て、本品の実用化を推進するとともに再生医療製品全般の実用化基盤整備を目指すものである。IK-01は、被験者の自己軟骨細胞をコラーゲンマトリックス内で培養し、限局性の膝関節軟骨損傷部位に移植することで軟骨損傷を治療することを目的とした再生医療製品である。IK-01は、欧州で製造販売されていた自己軟骨細胞加工製品であるが、先端財団が本品の日本における開発権を取得して薬事開発を推進し、平成24年3月に先端財団と神戸大学医学部附属病院の共同により治験届（医師主導治験）を提出した。治験課題名は、「限局性の膝関節軟骨損傷患者を対象とした自己軟骨細胞加工製品（IK-01）の安全性ならびに有効性に関する医師主導治験」である。平成24年度は、治験機器IK-01の主な製造工程を欧州の製造販売元（Arthro-Kinetics社＝AK社）において行い、3例の移植手術を実施した。その後、製造施設を日本に移すことが適切と判断したため、治験機器IK-01の製造施設を先端医療センターCPCに変更することについて、医薬品医療機器総合機構（以下、機構）と医療機器戦略相談対面助言を実施した。対面助言では、製造施設変更前後のIK-01の品質上の同等性・同質性を評価し、当該治験を継続しながら特性解析データを継続的に取得することで最終的な製造施設変更の妥当性を判断する、との考えを提案したところ、受入れ可能との回答を得た。これを受け、治験4例目からは、治験機器IK-01の製造施設を先端医療センターCPCとした。以上の経緯を踏まえて、本事業では、IK-01医師主導治験を実施する過程において、下記項目を実施した。

（1）治験薬GMPに対応した、試験物の製造・品質・衛生管理体制の整備

再生医療製品の初期治験時における設備・機器・システム・プロセスバリデーションに関して、必要十分な方法と内容を検討する。

（2）再生医療製品の同等性・同質性評価に必要な試験物の特性解析データ取得

自家細胞加工製品の同等性・同質性評価に関して、必要十分な品質特性データの内容を検討する。

（3）輸送用容器の評価

航空機輸送に耐えられる輸送用容器の検討と輸送バリデーションを実施し、輸送用容器の必要十分な条件を検討する。

（4）軟骨組織修復・再生の定量的評価

試験物を移植した軟骨損傷部位の組織修復・再生の定量的測定方法の検討を目的として、高磁場MRI撮影画像と力学的強度の測定による評価を実施する。

（5）産業化に向けた消耗品類の安定的入手のための取組

(6) 有識者会議

2. 各業務内容の詳細と結果及び考察

各業務内容の詳細について、以下に記載する。

(1) 治験薬 GMP に対応した試験物の製造・品質・衛生管理体制の整備

本治験における製造施設（場所）の変更に伴い、機構品質管理部による製造施設の書面および実地調査を受けた。調査の内容は、基本的には治験薬 GMP に対する準拠状況の詳細な確認である。

資料提出（搬入）は、平成 25 年 9 月初旬に行った。その後、施設の実地調査が、10 月 9 日～11 日の 3 日間行われた。実地調査（訪問確認）は、機構品質管理部の 3 人によって実施された。実地調査時には、主要工程の模擬製造を、ほぼ実際の製造通りに実施した。また、実地調査後に照会事項と回答のやり取りが数回あり、それに基づいて 12 月 26 日に対面助言が実施された。

施設調査（書面及び実地調査）において事前に提出した資料は多岐に渡るが、主なものは、以下である。

- GMP 体制図
- 施設に関する資料（特に空調、及び清浄度と差圧管理に関する資料）
- 治験製品に関する製造・品質管理に関する資料
- 製造・品質管理工程の作業フローが反映された人および物の動線図
- CPC 文書（標準書、基準書、手順書等）

以上の資料を整備・提出する必要があることは当然であるが、実際の実地調査時に確認されるのは、むしろ以下の内容である。

- 製造・試験検査・出荷に関する記録書
- 逸脱、変更管理書
- バリデーション計画書、報告書

これは、基準書・標準書・手順書が整備されていることを前提として、それらが適切に実行されていることを、文書による記録で確認することが調査の目的であり内容だからである。特に、逸脱管理は重要である。逸脱管理をするためには、そもそも基準と手順が明確な必要があり、そこから逸脱した場合に、それを文書として記録し、改善のための対策を講じることが求められる。以上より、従来のヒト幹細胞を用いる臨床研究における審査との本質的な差異を理解することができる。すなわち、ヒト幹細胞を用いる臨床研究における施設審査は原則として書面調査であり、審査内容は、

ハードとソフトの両面における施設の整備状況を確認するものである。一方、機構による調査では、上記のように、主として、記録書・報告書等を調査することで、実施状況を確認するものである。その意味で、文書管理状況（原本管理、生データ管理等）についても厳しい要求がある。我々の場合には、製造バリデーションの記録についての精査を受け、細かい指摘を受けた。また、実施状況を確認するためには、実施する作業者に対する教育訓練の状況と記録についても同様に厳しい要求がある。また、施設構造に関する調査はもちろん実施されるが、単に施設資料と実地確認だけではなく、環境モニタリングによる清浄度・差圧管理の状況が精査される。例えば、モニタリングデータの照査をどの程度実行しているか、逸脱管理を行っているか、また必要に応じて、微生物モニタリング等を行うことで清浄度管理を行っているか、等である。これらの要求は、我々が想定していたレベルよりも厳しいものであった。

一方、治験薬 GMP とフル GMP の差異は多岐にわたるが、バリデーション（ここでは、ベリフィケーションからフルバリデーションまで広い意味で使用する）のレベルの違いが一つの顕著な例である。今回の実地調査時に確認できたこととしては、開発初期段階におけるバリデーションに対する要求レベルは不必要に厳しいものではない、ということである。あくまでも実情に応じたバリデーションが求められると言ってよい。また、バリデーションの頻度についても、形式的に 1 年に 1 回一律に実施している場合が多いと思われるが、むしろ、重要度や実績に基づいて実施頻度を設定することが重要であることを確認することができた。バリデーションの対象は、設備・機器からプロセス、システム、試験（分析法）と多岐に渡る。不必要なバリデーションに多大な経費をかけるのではなく、必要かつ重要なバリデーションを適切に実施することは、再生医療の実用化にとって重要な課題である。

例えば、今回の施設調査においては、定期的に行っている施設・設備と製造機器のバリデーションに加えて、品質検査に用いる機器のバリデーションについても可能な限り実施し、適合した機器を治験時の品質検査に使用することとした。バリデーションは、基本的には各機器の仕様書の内容に従って行ったが、蛍光顕微鏡（組織学的解析）、マイクロプレートリーダー（軟骨細胞分泌因子の生化学的解析）、リアルタイム PCR 測定機器（軟骨細胞の遺伝子発現解析）については、一般的にバリデーションは実施されていない、あるいは現段階（初期治験段階）におけるバリデーション実施必要性が高くないと判断したことから、基本的な点検・校正・調整のみを実施した。品質検査機器のバリデーション方法と内容についての特別な指摘はなかった。

今回の施設調査において我々が学んだ最も重要な教訓は、治験薬 GMP 体制においては、製造部門と品質部門が独立しているとともに、連携して業務を実施することが重要かつ不可欠であるということである。すなわち、GMP は、体制としても施設としても、製造と品質の両方が、同じレベルで管理・運用されている必要がある。言い換えれば、GMP は、製造施設だけに求められるものではなく、試験施設にも同様に求めら

れる。我々の場合、その意識が弱く、製造施設と試験施設の管理が同じレベルではできていなかった。もちろん一般的には、製造施設の管理の方が厳しいことは確かであるが、例えば、無菌試験については、製造施設と全く同じレベルの管理・運用が求められる。開発の初期段階では、品質管理試験あるいは試験施設の管理体制が甘くなる傾向はおそらく一般的なことと思われる。しかし、分析法バリデーション等、評価する内容は極めて多く、十分な体制が必要であることには留意する必要がある。

(2) 再生医療製品の同等性・同質性評価に必要な試験物の特性解析データ取得

現在実施中の IK-01 医師主導治験の製造施設（場所）を変更するために実施した戦略相談対面助言においては、両製造施設（AK 社と先端医療センターCPC）でそれぞれ製造された IK-01 の品質特性データを用いて、その同等性・同質性を評価した。製造施設変更後も、治験時に取得する品質特性データを用いて製品の同等性・同質性を評価することが求められている。また今後も、製造施設変更・追加等の製造工程の変更時には、試験物の一貫性を保証するために、試験物の同等性・同質性評価が必要である。IK-01 の主要原料である自己軟骨細胞と自己血清については、その品質の個人差が大きく、品質特性データのバラツキを避けることはできない。すなわち、本質的にカスタムメイドである自家細胞加工製品の同等性・同質性評価は決して容易ではなく、今後の実用化・産業化にとって重要な課題である。

以上を踏まえて、今後の製造工程変更時に IK-01 の同等性・同質性を示すために必要な評価項目を設定することを、今回の治験時における特性解析データ取得の目的のひとつとした。IK-01 医師主導治験は、先端医療センターCPC を製造施設として再開後、本年度の本事業実施期間に 2 例の移植手術を行った（2013 年 12 月に 4 例目、2014 年 2 月に 5 例目）。特性解析には、移植用及び品質管理用 IK-01 と並行して作製した特性解析用 IK-01 を使用し、培養終了後に新規輸送用容器に封入した後、数日間冷蔵保管した状態のものをデータ取得に用いた。したがって、特性解析は安定性試験も含む内容となっている。特性解析は、基本的には、本品の品質特性データにより製品仕様を明らかにすることを目的としており、承認データとしての必要性から、機構にその実施を義務付けられているものである。以下に、IK-01 の品質特性を評価するために我々が設定し、機構の了解を得た特性解析の項目を示した。

- ① ゲルマトリックス内細胞の数と生存率
- ② ゲルマトリックス内細胞の増殖状態（増殖能）
- ③ ゲルマトリックス内の目的細胞（軟骨細胞）としての分化状態（遺伝子発現）
- ④ ゲルマトリックス内における目的細胞（軟骨細胞）の割合
- ⑤ ゲルマトリックスの高度（高さ）と力学的強度（硬度）
- ⑥ 軟骨細胞が分泌する軟骨組織に特有な細胞外基質の生化学的解析

- ⑦ 軟骨細胞が分泌する軟骨組織に特有な細胞外基質の組織学的解析
- ⑧ ゲルマトリックス内の細胞分布
- ⑨ 安全性試験（無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験）

特性解析の上記項目は、本品の仕様を規定するうえで必要十分な内容であり、同等性・同質性の評価においても十分と考えられた。事実、AK社から先端財団に製造施設を変更する際には、基本的には上記項目のデータを評価し、今後も評価を継続することに関して、機構から受入れ可能との回答を得ている。今回、先端医療センターCPCで製造したIK-01（4例目と5例目の2例）について実施した特性解析結果は、AK社CPCで製造した最初の3例（1～3例目）のIK-01の結果と比較して、顕著な差異は認められなかった。すなわち、現在までのところ、両製造施設で製造されたIK-01は同等・同質であることが示されている。一方、現在までの結果から、今後の製造工程変更時における同等性・同質性の評価に関しては、上記の特性解析データすべてを利用する必要はなく、本品の品質特性を十分評価できる内容であれば、一部分のデータでも十分ではないかとも考えられた。

例えば、IK-01の場合には播種細胞数が少なく培養期間が短いことから、細胞外基質に関する解析（項目⑥と⑦）の重要度は低い。事実、今回取得した特性解析データにおいても、AK社の製品と同様に、軟骨組織特有の細胞外基質は検出されなかった。そもそも本品の設計思想では、生体外で軟骨組織を形成した後に移植するのではなく、生体内に移植後の増殖と組織形成に期待している。したがって、細胞外基質に関するデータ（項目⑥と⑦）は本品の品質特性を表わすものではない。すなわち、同等性・同質性評価のためには、製品特性に依存した品質特性データ評価項目を設定することが重要である。すなわち、上記の特性解析項目のうち、⑥と⑦は同等性・同質性評価には必須ではないと考えられた。したがって、今後の製造工程変更時にIK-01の同等性・同質性を示すためには、上記項目から⑥と⑦を省略した内容を評価することで十分可能と考えられた。以上のように、製品の品質仕様を明らかにするための品質データのうち、製品特性を示すために必要なデータのみを同等性・同質性評価に利用する方法は、一般的に通用する考え方と思われる。

主要原料であるラット尻尾腱由来コラーゲン-MSについても、今後先端医療センターCPCを製造施設にすることを予定しており、コラーゲン-MSの生化学的及び物理化学的な特性解析データによりその同等性・同質性を評価する。

（3）輸送用容器の評価

IK-01の輸送用容器として使用中の製品は、二重かつ密閉度が高く、航空機輸送に伴う気圧変化にも耐えられる特徴がある。しかし、本製品が製造中止になったことから、代替品の探索が必要となっている。

本年度の本事業実施期間中に、候補となる複数の輸送用容器を同定した。そのうちのひとつについては、輸送バリデーションの一環として、上記特性解析用 IK-01 の封入に使用し、封入後の安定性・安全性を評価する試験（無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験）を行った。第一に、培養終了後の IK-01 を培養プレートから容器に移して封入すること、その後に容器から取り出して試験検査に供すること等を実施することで、IK-01 の輸送用容器として使用可能であることを確認した。また、上記試験への適合により、封入後の IK-01 の安定性・安全性を確認した。さらに、輸送時の条件を想定して、輸送用溶液を加えた状態で容器に激しく振動を加えることで、液漏れがなく、容器の密閉度に問題がないことも確認した。ただし、本容器はその形状に関して IK-01 の輸送用容器として理想的とは言えないことから、今後は、本容器を含む複数の候補品を用いて検討を進める。

（４）軟骨組織修復・再生の定量的評価

本品の対象疾患は症候性の限局性膝関節軟骨損傷または離断性骨軟骨炎であり、本品移植により、膝軟骨損傷に伴う痛みの除去と膝機能の回復という効果が期待できる。本治験における有効性評価としては、主として、IKDC スコア等による膝関節機能および疼痛の評価を用いている。IKDC スコアは、質問に対する患者の回答に基づいて算出され、患者の身体機能の回復度、疼痛度、および膝関節の機能を評価するものである。

一方、IK-01 移植治療が目標とする軟骨組織再生に関する評価手法の開発は重要な課題である。本治験において評価を試みている軟骨損傷の修復程度の評価手法は、主に、MRI 画像撮影による評価と力学的強度（硬度）測定による評価である。高磁場（3.0 テスラ）MRI 撮影画像については、移植片と隣接軟骨組織との適合性に加えて、再生軟骨組織の評価についてもある程度可能とされている。具体的には、矢状断 3.0T（テスラ）-MRI を、以下の各撮像法で撮影し、信号強度を評価した。

① 脂肪抑制プロトン密度強調画像（FS-PDWI）

プロトン密度強調像では、軟骨と関節液、軟骨下骨との間に比較的良好なコントラストが得られるため、関節軟骨の評価に有用である。

② T1 rho mapping と T2 mapping

T1 rho と T2 マッピングは軟骨中のコラーゲンの配列や水分含有量が評価可能な MRI 撮像法であり、軟骨変性度の定量的評価に有用である。

移植部位における軟骨組織修復の指標としては、表面構造が滑らかであること、隣接軟骨組織との適合性がよいこと、再生軟骨組織の変性程度が低く、軟骨基質の濃度

が高いことなどが挙げられる。軟骨組織の形態的評価としては主に FS-PDWI を用い、軟骨組織の質的評価としては T1 rho mapping と T2 mapping を用いた。また、軟骨組織の力学的強度（ヤング率と応答緩和特性）について、ポータブル型装置を用いて測定し、移植部位と健常軟骨組織を対比することで軟骨修復組織を評価した。

本治験における MRI 撮影と硬度測定のスケジュールは以下である。

検査スケジュール	
MRI 撮影	移植手術前、術後 2 週目、12 週目、24 週目、52 週目
硬度測定	移植手術時、術後 52 週目

本年度の本事業実施期間中に実施した各症例の MRI 撮影と硬度測定は以下である。

被験者	MRI 測定	硬度測定
1 例目	術後 52 週目	術後 52 週目
2 例目	術後 52 週目	術後 52 週目
3 例目	術後 52 週目	術後 52 週目
4 例目	移植手術前、術後 2 週目、12 週目	移植手術時
5 例目	移植手術前、術後 2 週目	移植手術時

これらの結果については、最終的なデータ固定は未実施であり、全体の解析についても全データ固定後に実施される予定であることから、現時点で確定的に結論できることはない。しかし、治験責任医師あるいは担当医師、また放射線科医師の現時点における印象及びコメントをまとめると以下のようになる。

測定方法		測定の必要性・信頼性	臨床症状との相関
MRI	FS-PDWI	移植部位の決定に必要。 (形態学的評価のみ)	術後に見られる信号強度の経時的変化が浮腫の推移などを反映していると考えられる。
	T1 rho mapping	測定対象の移植部位が小さく、測定値のばらつきがある。周囲の関節液が信号に影響している可能性有り。	経時的に信号が低下しているため臨床症状と相関していると考えられる。
	T2 mapping	同上、ただし T1 rho よりもばらつきは小さい。	同上。
力学的強度（硬度）		技術的に容易で再現性もある。	硬度と鏡視所見、及び臨床症状については相関がある印象だが、現時点では不確か。

以上、各測定方法の現在までの実績としては、測定価値が十分あるという見解だが、T1 rho mapping については、測定値のばらつきがやや大きいことから、その程度に依存して、今後の検証的治験において検査項目として含めるかどうかが決まると考えられる。また、各測定値と臨床症状との相関については、最終的な結果を待つ必要があり、現時点では確定的なことは言えない。

(5) 産業化に向けた消耗品類の安定的入手のための取組

再生医療の産業化のためには、消耗品類の安定的かつ低コストによる入手が重要である。そこで、本事業においては、再生医療製品の製造に用いる原材料等について、安定的な入手と低コスト化に資する製品の導入に関する検討を行った。

第一に、コラーゲンマトリックス培養プレートの検討を行った。現在は、AK 社と同一品を使用しているが、軟骨細胞培養はコラーゲンマトリックス中で行われており、培養プレートについては同等品を使用することが可能と考えられた。そのため、予備的な検討として、他社の培養プレート製品を使用し、コラーゲンのゲル化とその後の培養に問題ないことを確認した。

第二に、コラーゲン-MS を抽出・調製するための SPF ラットについて、現在入手しているドイツのチャールズ・リバー社から日本のチャールズ・リバー社に変更するための検討を開始した。本年度の本事業実施期間中には、ドイツから入手したラット尻尾腱を用いてコラーゲン線維を単離し、コラーゲン溶液の調製を行った。調製したコラーゲンについては、その無菌性に加えて、コラーゲン濃度（乾燥重量）やゲル化能（中和後、一定時間内にゲル化する性能）が規格に適合することを確認した。今後は、日本から入手したラットによりコラーゲンを調製し、品質特性データを取得することにより、原料入手先変更を進めていく。

(6) 有識者会議

本年度の本事業実施期間中に実施した内容のうち、治験機器 IK-01 製造に関連した内容においては、目標が達成できたと考えている。そこで、その内容を中心として、推進会議を開催した（2014年3月）。再生医療一般に造詣が深く、再生医療製品製造関連の規制にも精通している国立医薬品食品衛生研究所の佐藤陽治部長に有識者として参加していただき、進捗内容の確認をしていただいた。その際、同等性・同質性評価項目に関する当財団の考え方、すなわち、申請時に必要な非臨床及び品質特性項目と、出荷時に必要な品質規格項目の中間に、製品の品質特性を示すために必要十分な内容としての同等性・同質性評価項目を位置付ける考え方、について意見を求めた。その結果、当財団の考え方は妥当であり十分理解できる、とのコメントをいただいた。当局（機構）は、製品の

品質特性を示すために必要十分な項目を明らかにするためにも、最初は多くの項目に関するデータを求める傾向がある。そこから必要十分な評価項目を選択し、その妥当性を説明するのは申請者の課題であり、適切な論理構築が必要と考えられる。

3. まとめと今後の課題

本事業は、治験機器 IK-01 の医師主導治験を実施する過程で、本品の実用化を推進するとともに、再生医療製品全般の実用化基盤整備を目標とした。本事業において、再生医療製品の初期治験時における治験薬 GMP 体制整備と同等性・同質性評価に必要な評価項目の検討に関して、特に十分な成果を達成することができたと考えている。どちらの場合にも共通して言えることとして、当局（機構）は、決して一律な評価やバリデーションの実施を求めているわけではない、ということである。重要なことは、実績データを用いて設定根拠を十分に説明できることと考えられる。

今後は、進行中の IK-01 医師主導治験を完遂し、可能な限り早く検証的治験を開始することが課題である。そのためには、コラーゲン-MS の同等性・同質性評価を行うこと、新規輸送用容器を決定し、航空機輸送のバリデーションを終了すること、軟骨組織修復・再生の定量的評価方法を含めて、検証的治験時の臨床的評価方法・項目を決定すること、などが今後の重要な課題となる。

以上