平成 25 年度再生医療等産業化促進事業
（角膜上皮幹細胞疲弊症、自家培養口腔粘膜ｼｰﾄ）
報告書

平成 26 年 3 月

委託元　経済産業省

委託先　株式会社セルシード

目次

角膜上皮再建後の「角膜血管新生の阻害能」及び「安定した上皮の回復による視軸上の結膜化」の定量的評価方法の開発 3
計画 3
実施内容 5
実施結果（血管新生） 5
実施結果（結膜化） 7
今後の検討課題 9
再生医療の実用化、産業化を目指した、「細胞培養工程の自動化」の導入に対する有効性の調査 11
計画 11
実施内容 11
安全性を担保したフィーダー細胞のバンク化検討 12
実施結果（バンク化検討） 12
GMP 下にて安定供給可能な専用培地の製造検討 17
実施結果（国産添加因子の切り替え検討試験） 17
実施結果（国内 C 社特注培地の同等性検討試験） 20
総括 25

角膜上皮再建後の「角膜血管新生の阻害能」及び「安定した上皮の回復による視軸上の結膜化」の定量的評価方法の開発

計画

これまで、角膜上皮再建後の有効性評価として角膜上に新生、侵入する血管の定量を事前のグレーディングを行った上で実施しているが、微細血管はその径の大小、分岐の程度、脈動性の有無等、目視での判定が非常に難しい。しかし、角膜上への血管の侵入は視覚だけではなく、炎症や疼痛等の原因ともなり、その判定は有効性評価に重要である。

また、角膜上の結膜化の評価も事前にグレーディングを策定した上で、眼科医による判定が行われているが、眼科医によって判定基準にバラツキがあり、かつ同一眼科医でも観察日により判定が異なることが多々あることをフランスで実施した治験で経験し、評価の客観性に乏しいと当局から指摘を受けた。さらに、視覚に影響のある視軸上の結膜化の程度を厳密に検出できない問題がある。

表 1 フランス臨床試験における術後 12 ヵ月経過時の有効性評価基準（主要エンドポイント）

評価項目	評価グレード	判定基準
角膜上血管新生	輪部からの細血管侵入数	半定量的
血管活動性	非活動性、より小さい血管、径の異なる血管、径の大きな血管、太い血管	定性的
角膜上上皮結膜化	あり、なし	有無のみ
上皮欠損	潰瘍なし或いは軽度の潰瘍、中等度、重度	定性的
点状上皮角膜症	軽度、中等度、重度	定性的

本計画は非侵襲的に眼表面を撮影し、その撮像から血管のみを画像解析により検出する手法をさらに発展させ、得られた微細血管像の形状、特性を定量的に情報化しうる方法論を検証する。基礎となる技術は角膜上皮面積に対する血管の面積比率のみを算出しうる段階であり、実際の臨床評価に必要な血管自体の特性を把握するためには、更なるアルゴリズムの構築が必要であるが、これが実現できれば角膜上皮のみならず、他の再生医療製品の評価方法にも供することができる技術であると考えている。

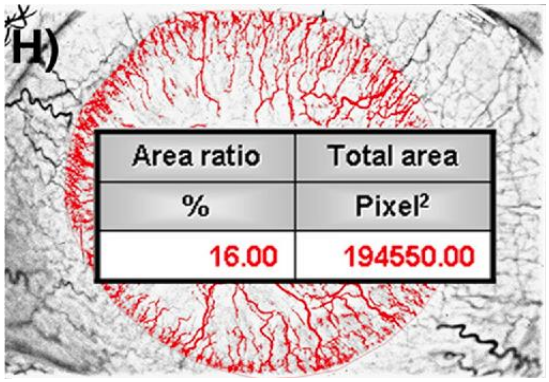


図 1 角膜面積に対する血管面積の算出

さらに治療の効果を検定する有効性評価法として、血管新生とともに重要である角膜上皮上の結膜化に対し、結膜を非侵襲的かつ特異的に染色し得る方法と、その染色像の画像解析による定量評価を組み合わせることで、治験、および市販後調査等の評価に資する方法論を確立する。

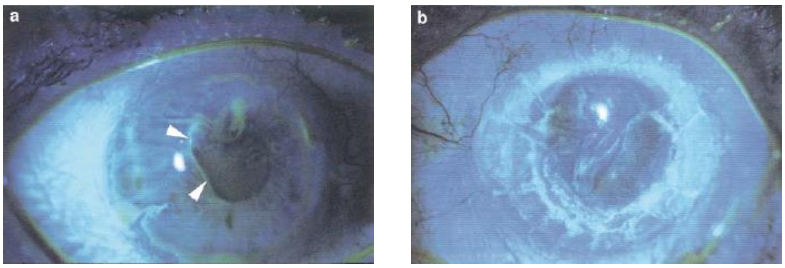


図 2　LSCD 患者の結膜化染色画像

なお、これまでの医師による判定と画像解析の判定結果の同等性、及びより高精度であることを確認するための確認が必須であり、当社が実施した本製品の治験責任医師と綿密に摺り合わせ、かつ他の眼科専門医もその判定基準が妥当であるかを厳密に検証する必要がある。さらには、本事業において治験実施機関、治験実施企業以外に画像解析を客観的に実施しうるリーディングセンターを設置し、評価の定量性をより担保するシステムの構築を試みる。

実施内容

独国ケルン大学病院教授であり、同国フリードリヒ・アレクサンダー大学医学部眼科学所属時から角膜上への血管新生と角膜移植に関する研究を行っている Claus Cursiefen 教授に本検討の趣旨の説明を行い、協働の契約を締結した。

その上で、先ず予備検討として弊社がフランス　リヨン国立病院にて実施した角膜上皮幹細胞疲弊症(Limbal Stem Cell Deficiency；LSCD)に対する自家培養口腔粘膜シート(Cultured Autologous Oral Mucosal Epithelial Cell Sheet; CAOMECS)の治験を実施した際に取得した、患者の術前スリットランプ画像、及び術後 1 年経過時画像を提供し、予備的な検討を実施した。また、本画像解析の技術は微細血管自身が有する血液の色を画像抽出の境界として利用しているが、一般的に診断に用いられているフルオレセイン色素が特定の条件下（染色時間）で角膜上の結膜に対して高いコントラストを示す（上皮細胞層はフルオレセインによる染色を受けない)。この特性を応用して、フルオレセインの染色境界を画像解析にて抽出することにより同様に面積計測を元とした評価を実施した。

実施結果（血管新生）

予備検討として送付した 25 例のスリットランプ画像に対し、解析に不適であった 7 例を除いた 18 例の画像解析を盲検法のもと実施し、その結果を表 **2** に示す。

表 2　血管新生の臨床評価とデジタル解析評価結果の比較

	血管（茎）数（臨床評価）	血管活動性（臨床評価）	血管占有面積（%）	血管（茎）数（臨床評価）	血管活動性（臨床評価）	血管占有面積（%）
患者番号	術前	術前	術前	移植 360 日後	移植 360 日後	移植 360 日後
1	10	混在	×	0	なし	×
2	3	混在	×	0	なし	×
3	4	混在	6.50	3	小	***10.67***
4	10	混在	3.75	2	小	***6.36***
5	20	混在	×	−	−	×
6	10	混在	×	1	小	×
7	5	大	14.97	1	小	2.65
8	20	混在	8.5	0	なし	4.2
9	20	混在	×	2	小	×
10	25	混在	5.55	3	小	***10.25***
11	23	混在	3.16	0	なし	2.75

12	30	混在	13.15	7	小	***15.21***
14	20	混在	7.12	4	小	4.83
15	40	混在	8.94	2	小	3.97
16	30	大	9.81	3	混在	***12.02***
17	30	混在	10.31	12	混在	***16.91***
18	20	混在	×	10	小	×
19	30	混在	3.66	8	混在	0.58
20	20	混在	2.41	3	小	***4.71***
21	30	混在	6.92	8	小	***8.59***
22	4	小	5.49	0	なし	4.68
23	10	混在	20.21	5	小	2.76
24	20	混在	×	−	−	×
25	20	大	19.84	20	小	11.64
26	30	混在	19.55	12	混在	15.20

太字斜体は臨床評価（主観的）と画像解析結果（客観的）に逆転が見られた例

上表の通り、従来の目視による臨床評価からは新生血管の減少が確認され、またその血管（茎）サイズの低下が確認されたことから CAOMECS による LSCD に対する角膜上皮再建治療は角膜上皮層への血管新生を阻害していることを再確認した。

主目的である画像解析による角膜上の新生血管の定量に必要である眼表面上の微細血管像の半自動抽出も可能であり（図 3）、術前術後の微細血管の面積を数値化できることが確認された。

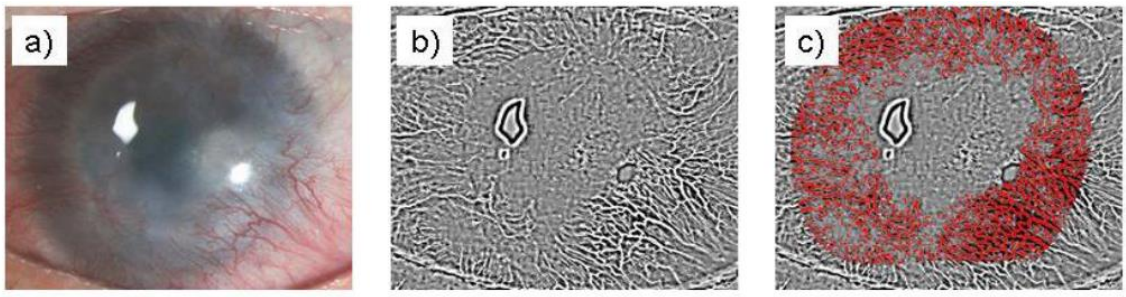


図 3 微細血管の検出（a）スリットランプ撮像、b）コントラスト調整、c）微細血管の抽出

しかしながら、主観的な評価（目視評価）では明らかに術後の微細血管の血管径、血管数が低下（改善）しているにもかかわらず、客観的な評価（半自動画像解析）では血管面積が増大している例も見られた（表 2 中、**太字**の患者番号）。これらを踏まえ、画像解析による定量化結果を数値化した（図 4）。

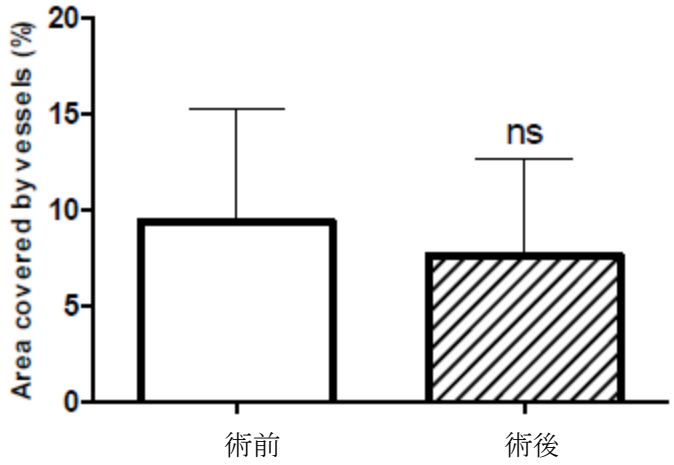


図 4　術前術後の血管面積比較

面積比較の結果、目視評価では明らかな血管面積の減少が確認されたにもかかわらず、客観評価では、術前術後に有意差が見られなかった（詳細は別添 1 参照）。

これは、

① 提供画像が治験時の記録写真であり、本解析法に最適化（撮影条件、解像度等）されていなかったこと、

② 血管新生のグレーディングに必要な血管径、血管数等を 2 次元的な血管面積から求めることが①の理由から困難であったため、

であり、本予備検討からだけでは、主目的である盲検下での主観的な評価と客観的な評価を完全に関連付けることはできなかった。ただしこの検討は予備的なものであり、血管新生のグレーディングに必要な情報（血管径、血管数、脈動性有無等）を 2 次元的なスリットランプ画像から抽出、分離、解析を行うために、眼疾患により角膜上に血管が侵入している患者から、撮影条件を最適化したスリットランプ像を新たに入手し、より詳細なグレーディングを実施する必要がある。

実施結果（結膜化）

視軸上の結膜化の定量を下記の通り実施した。なお、別添報告書中（別添 1）では Epithelial defects（上皮欠損）と記載しているが、眼表面の上皮欠損は、結膜化に進行する、若しくは結膜化に起因するため、本予備検討では上皮欠損の評価を、結膜化を含めたより網羅的な損傷の指標として示している。

本検討はフランスでの治験時にフルオレセイン染色後の撮像に対し、血管新生評価と同様に盲検下にて 25 例の撮像から解析に適した 16 例の画像解析をケルン大学にて実施した。

表 3　血管新生の臨床評価とデジタル解析評価結果の比較

	持続性上皮欠損（臨床評価）	点状上皮角膜症（臨床評価）	染色面積（%）	持続性上皮欠損（臨床評価）	点状上皮角膜症（臨床評価）	染色面積（%）
患者番号	術前	術前	術前	移植 360 日後	移植 360 日後	移植 360 日後
1	軽度	軽度	32.27	なし	軽度	7.60
2	なし	重度	×	なし	軽度	×
3	中程度	軽度	20.89	なし	軽度	7.71
4	なし	中程度	25.83	なし	軽度	1.28
5	軽度	中程度	×	－	－	×
6	なし	軽度	×	なし	なし	×
7	軽度	中程度	21.50	なし	なし	17.39
8	軽度	重度	8.45	なし	軽度	0.00
9	軽度	中程度	×	なし	なし	×
10	なし	中程度	19.89	なし	なし	14.43
11	軽度	重度	35.82	なし	軽度	21.34
12	軽度	軽度	12.51	なし	軽度	***15.37***
14	軽度	重度	7.08	なし	軽度	4.40
15	なし	重度	24.93	なし	軽度	5.07
16	軽度	重度	×	なし	軽度	×
17	なし	重度	36.89	なし	なし	21.36
18	軽度	軽度	×	軽度	なし	×
19	なし	重度	4.33	なし	中程度	1.96
20	なし	重度	19.06	なし	軽度	***19.69***
21	なし	重度	16.94	なし	軽度	8.69
22	軽度	中程度	16.91	なし	なし	5.80
23	なし	重度	11.14	なし	なし	0.02
24	軽度	中程度	×	－	－	×
25	軽度	中程度	×	なし	軽度	×
26	なし	軽度	×	なし	軽度	×

太字斜体は臨床評価（主観的）と画像解析結果（客観的）に逆転が見られた例

上表の通り、従来の目視による臨床評価でも CAOMECS による LSCD に対する角膜上

皮再建治療は角膜上皮の結膜化を低減させていることを再確認した。また、客観的な半自動画像解析（図 5）による結膜化の定量の結果（図 6）からも術後の結膜化の低減は有意な差を示すことが確認された。

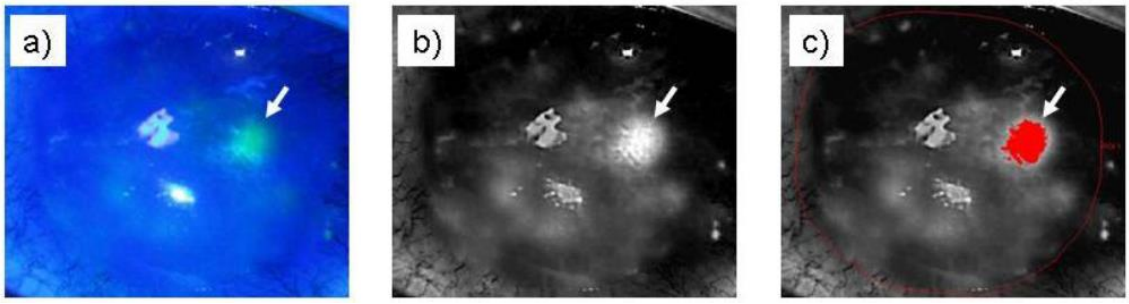


図 5　上皮欠損の検出（a）フルオレセイン染色像、b）コントラスト調整、c）上皮欠損部の抽出

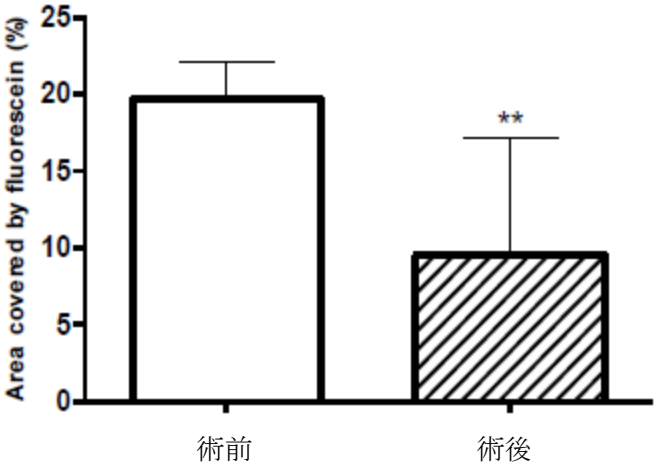


図 6　術前術後の結膜（上皮欠損）面積比較

この有意差から本来求められる至適な撮影条件ではなくとも、結膜化の評価は画像解析により可能であることが示唆された。なお、より検出精度を高めるために、視軸上に結膜化を生じている患者から至適な染色、撮影条件にて撮像を入手し、それをシミュレーションモデルとして用いることで、より確度の高い有効性評価方法を設定できると考えられる。

今後の検討課題

本検討から視軸上の結膜化、および角膜上皮への血管侵入（新生）の阻害能を画像解析という客観的な評価方法にて実現しうることが確認された。血管新生のグレーディングには前述のように更なる解析アルゴリズムの設定が必要ではあるが、撮影条件の最適化を図る

ことで実現できると考えている。

再生医療による角膜上皮再建の有効性評価として資するには、これらの最適化を進め、眼再生医学の有識者の助言のもと、独立行政法人 医薬品医療機器総合機構（PMDA）に対し、本技術の妥当性の理解を求める必要がある。

再生医療の実用化、産業化を目指した、「細胞培養工程の自動化」の導入に対する有効性の調査

計画

これまでの当社の経験や、他機関の実情を鑑みると、再生医療製品は、患者（もしくはドナー）毎に細胞源として採取した細胞の特性（増殖性、増殖速度、製品としての構造等）にバラツキがあり、同一製品にも係らずその製品特性にバラツキが生じてしまう。また、所謂手作業での培養作業であり、作業者の技能に製品性能が少なからず依存する。そのため、作業者はかなりの熟練度を要求されるが、手作業であるがゆえ、作業者適正のみならず高度な教育訓練が要求されるため、再生医療製品の増産に対する即応性が乏しい。さらに、現在は施設に依存した作業標準書（SOP）をもとに製造しているため、増産時には新たな施設でのSOP の更新、及び新施設で製造した製品の同等性検証が求められる。

そこで、本計画ではそれらの課題に対応するために今後導入が必須と考えられる再生医療製品の自動製造（装置）工程が実用化しうる際に必要な手作業製品と自動製造製品の同等性確認方法の検討を試み、よりスムーズな薬事承認をなし得るシステムの検証を試みる。また同時に、再生医療製品の大量生産時に必要となる多量な培地、資材類を安全性が担保され、コスト削減に資する製品に切り替える検証を行い、製造コストの削減も含めた検討を実施する。

実施内容

再生医療製品製造の自動化を検討するにあたり、先ず現在の手作業での培養（製造）工程の安定化について検討を実施した。当社はフランスにて LSCD 患者に対し CAOMECS の治験を実施し、欧州医薬品庁（EMA）に承認申請を行っている。その経験から、患者の採取組織（口腔粘膜組織）から最終製品（CAOMECS）を製造するにあたり、患者毎に最終製品を至適な条件まで培養を実施する期間にバラツキがあることが確認されているが、このバラツキをより制御するためには、各工程の安定化が重要であると認識している。さらに本培養工程には、フィーダー細胞（マウス繊維芽細胞：NIH/3T3 細胞）からの栄養補助が必要であり、その安全性を担保する必要がある。

また、本培養に用いる培地には一般的な基礎培地の他に多種の必須因子を添加する必要があるが、それらの因子の供給安定性が確保できないと安定生産には繋がらず、その因子自体の性能（活性）が変動することは最終製品のバラツキに影響を与えてしまう。そこで、再生医療製品の安定製造に必要な、

① 安全性を担保したフィーダー細胞のバンク化検討、

② GMP 下にて安定供給可能な専用培地の製造検討

を自動化検討に先んじて実施した。

安全性を担保したフィーダー細胞のバンク化検討

CAOMECS の製造にはフィーダー細胞として細胞分裂をマイトマイシン C（MMC）処理により停止させた NIH/3T3 細胞を共培養する必要であるが、異種細胞であるためその安全性を担保しつつ、かつ性能が均一なセルバンクの構築が必要であり、具体的にはセルバンクの製造、保管、および生物由来原料基準に基づいた各種安全性試験を GMP 準拠施設に外注することが要求される。また、このフィーダー細胞は液体窒素温度で保管・保存しなくてはならず、再生医療製品製造拠点（細胞加工施設：CPC）まで安定に輸送することが必要である。これらのことから、セルバンクは CPC に距離的に近いことが望ましいが、当社はこれまでに米国企業（以下米国 A 社）にてセルバンクを作製しており、輸送安定性（供給安定性）が必ずしも高くはない。そのため、国内再生医療の実現のためには国内にセルバンクの製造保管拠点を設置する意義は大きく、GMP 下でセルバンクを構築しうる国内業者を調査した。その結果、候補として選定した企業（以下国内 B 社）に具体的な製造内容について折衝を行った。

実施結果（バンク化検討）

国内 B 社でのセルバンク製造可否を検討するため、2013 年 10 月 29 日に国内 B 社事業所で現地調査を行った（別添 2：出張報告書）。米国 A 社との比較項目を下表 4 にまとめた。

表 4 米国 A 社と国内 B 社における NIH/3T3 フィーダーセルバンクの製造保管条件の比較

企業	米国 A 社	国内 B 社
製造施設規格	FDA cGMP 準拠	GMP 準拠（FDAcGMP 準拠の別プラントもあるが、設備・人材の制限上、本セルバンクの製造には使えない）
製造ロットサイズ（バイアル本数）	200～250 本	既存の工程：60～80 本 工程を改良できれば期待できる最大数：120~170 本（ただし実績がないので、実現可能か不明）
製造費用	約 350 万円 （最新契約：33772 ドル。基本安全性試験含む）	未公表（A社と比較して高額） ロット拡大に工程改良を行う場合はさらに追加料金が必要
バイアル 1 本あたりの費用	約 1.6 万/バイアル （基本安全性試験含む）	未公表（A社と比較して高額）／バイアル （＋基本安全性試験の費用）
製造期間	1 ヵ月（基本安全性試験含む） 要事前調整	2 ヶ月(工程改良のため予備検討・試作が必要な場合：＋1~2 ヶ月)

マイトマイシン C 処理時の製造体制	インキュベータ 4 台、クリーンベンチ 2 台、作業員 3〜4 名。 4〜5 時間で 300 フラスコ（T225）以上の処理が可能。	インキュベータ 1 台、クリーンベンチ 1 台、作業員 2 名。拡大をするのが困難なため、一度に処理可能な培養フラスコの数がロットサイズを制限する一番のネックとなる。
製造経験	2011 年より 3 回 MMC 処理済みセルバンクの製造を外注した。マスター、ワーキング、MMC 処理済みセルバンクの各製造を全て一連で受注可能。	2005 年〜2011 年の間にセルバンク構築の工程開発を委託した経験があり、2 回 MMC 処理済みセルバンクの製造実績あり。
基本安全性試験（細菌、マイコプラズマ、エンドトキシン否定）	標準で出荷品質試験として実施され、分析証明書（CoA）が発行される。	実施不可能（他社への外注が必要）
生物安全性試験（ICH Q5A、Q5D 基準：細胞同定、各種ウイルス否定、造腫瘍性否定）	全て実施可能	実施不可能（他社への外注が必要）
保管条件	同施設で製造したものは GMP 管理下で保管可能	同施設で製造したものは保管可能。ただし保管タンクが 1 台しかなく、他プロジェクトとのスペースを考慮して要相談
保管・輸送費用	年間保管費用　約 100 万円 (セルバンク、バイアル数による) 各輸送につき： - 出荷管理費用　約 8 万円 - 国際輸送費用　約 20 万円	要相談

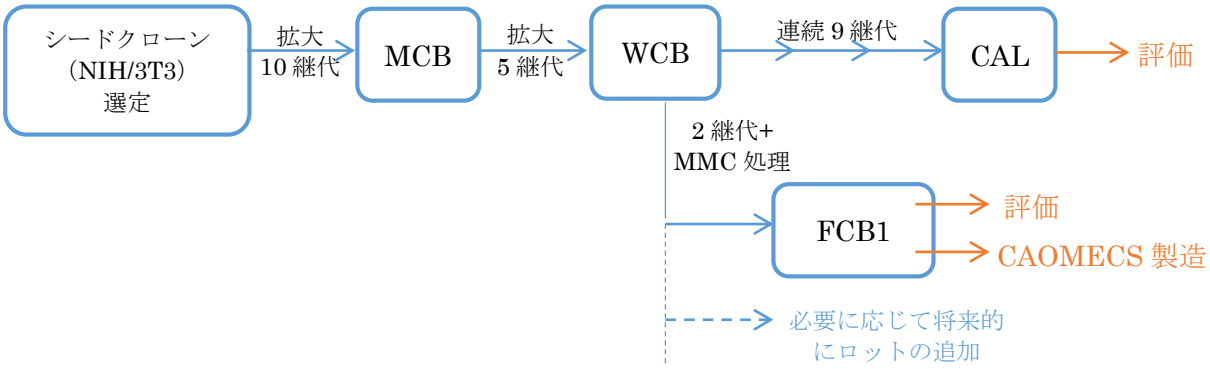
国内 B 社では GMP 管理下での製造自体は可能であるが、規模が米国 A 社より小さいために 1 ロットの製造量が極端に少なく、製造単価が高くなる。また、ロットサイズ拡大のための工程改良案もいくつか検討したが、どれも実績がないため予備検討時点で開発委託が必要となり、仕様を満たしうるか不確定要素を含んでいる。それでも米国 A 社の製造量（ロットサイズ）には及ばず、さらに自社で安全性試験を行うことができない。また、長期保管は可能ではあるが現時点では体制が整っていないため、国内製造であれば輸送費等を軽減

できる事を考慮しても、バイアル 1 本あたりの製造費用が確保できるロットサイズにより高額となり、更にロット間比較試験の時間とコスト（ロットサイズが小さければ比較試験の頻度が上がるため）および安全性試験の別施設への外注が必要となるので、現時点ではセルバンクの国内 B 社での国産化は難しく、米国 A 社にフィーダーセルバンクの製造、保管、および各種安全性試験を外注することが好ましいと判断した。ただし、今後も国内に本拠を有するフィーダーセルバンクの製造保管を委託できる企業を継続調査する必要がある。

また、上記理由から本事業に供するために今後の治験に利用する予定のフィーダー細胞と同工程で作製したセルバンクの品質評価・安全性試験を米国 A 社にて実施した。

図 7 に現行フィーダーセルバンクシステムの概要を示す。国際ガイドライン ICH Q5A および Q5D の基準に従い必要とされる試験のうち、本事業の期間内で行ったのは MMC 処理済みフィーダーセルバンク「FCB1」の細胞同定試験とウイルス安全性試験、および「CAL」（cells at/beyond the limit of *in vitro* age＝製造のために *in vitro* 細胞齢の上限にまで培養された細胞）の細胞同定試験、ウイルス安全性試験、造腫瘍性試験である。マスターセルバンク（MCB）およびワーキングセルバンク（WCB）の評価試験は事前に実施済みである。

図 7　現行フィーダーセルバンクシステムの概要



下表 5 と表 6 に実施した試験内容と結果を示す。米国 A 社が提出した各試験の報告書は別紙に添付する。

表 5　FCB1 で実施した品質評価・安全性試験

試験項目	試験内容	結果
非内在性ウイルスおよび外来性ウイルス可否試験	*In vitro* assay using MRC-5, Vero 76 and NIH/3T3	陰性
	In vivo assay with guinea pigs, mice, and embryonated chicken eggs	陰性
細胞同定	Isoenzyme analysis	同定

		（マウス）

表 6　CAL で実施した品質評価・安全性試験

試験項目	試験内容	結果
非内在性ウイルスおよび外来性ウイルス可否試験	*In vitro* assay using MRC-5, Vero 76 and NIH/3T3	陰性
	In vivo assay with guinea pigs, mice, and embryonated chicken eggs	陰性
レトロウイルス否定試験	Extended Mink S+L- focus induction assay	陰性
	Extended XC plaque assay	陰性
	RT-PCR assay	陰性
	Transmission Electron Microscopy (TEM)	陰性
その他感染性微生物否定試験（培養にウシ血清およびブタ由来トリプシンを使用しているため、ウシ、ブタ関連ウイルスを検査）	*In vitro* test for Bovine adventitious viral agents	陰性
	Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) PCR test	陰性
	In vitro test for Porcine adventitious viral agents	陰性
	Porcine Parvovirus (PPV) PCR test	陰性
	Porcine Circovirus Types 1 and 2 (PCV-1, PCV-2) PCR test	陰性
細胞同定	Isoenzyme analysis	同定（マウス）
造腫瘍性	*In vitro* test: Growth of cells in soft agar	陽性*1

*1：当該 *in vitro* 造腫瘍性試験は陽性コロニー数がコントロールとサンプル共に非常に少なく試験の信頼性が低い懸念がある。（以前 MCB に対して実施した試験時はコントロールにて 1000 個以上のコロニーが観察されたのに対し、本試験では 20～60 個）

ウイルス関連安全性試験は全て陰性であり、またいずれのサンプルもマウス細胞であることが確認された。しかし CAL における造腫瘍性試験で陽性の結果が示された。通常の培養条件における NIH/3T3 細胞に造腫瘍性は予測されておらず、以前行った継代前の MCB における試験は陰性の結果を示した。しかし当社が設定した CAL の製造では、より高い安全性を求めるために「製造における細胞齢の上限」を大幅に上回る継代数（事実上の上限は WCB から 2 継代に対して、9 継代）を行っており、過剰な継代によりゲノム安定性が保たれていなかった可能性を否定できない。国内指針（「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針」に基づく 3T3J2 株及び 3T3NIH 株をフィーダー細胞として利用する上皮系の再生医療への指針）では、造腫瘍性試験は CAL ではなく継代前の WCB で行うことが求められているので、当社の CAL の継代数（合計 24 継代）は過剰であった可能性

がある。低い継代数では造腫瘍性が陰性であることは、2012 年に実施した同系列のセルバンクの MCB（10 継代）の試験、及び 2007 年に実施した別系列のセルバンクの MCB（13 継代）の試験にて確認している。実際に CAOMECS 製造に使用するフィーダー細胞は WCB にて 15 継代、FCB1 にて 17 継代なので、その範囲で試験する方が妥当であると考えられる。

今回の調査で米国 A 社は治験申請に要求されうる細胞同定試験および各種ウイルス試験を履行することができ、フィーダーセルバンクの安全性が示された。しかし造腫瘍性試験にのみ試験条件の妥当性に懸念が示されたため WCB および CAL を用いて、米国 A 社又は別施設での造腫瘍性の再試験を検討する必要がある。

GMP 下にて安定供給可能な専用培地の製造検討

CAOMECS の培養に必要な添加因子類は多くの場合海外製を選定、利用していたが、供給安定性に対するリスクを経験しており、今回は極力国内製、かつ供給安定性が確保できる試薬類への切り替えを検討した。また培地自体もこれまで培養室（試薬調製室）にて手作業で多数の添加因子を基礎培地に添加していたが、GMP 準拠の製造ラインを有する国内 C 社に専用培地の特注を依頼し、培地自体の国産化の検討を実施した。

実施結果（国産添加因子の切り替え検討試験）

CAOMECS の製造工程に用いる培地は、

- DMEM/Ham's F12 の混合基礎培地を元に、上皮細胞の増殖を促進する添加因子および抗生物質等を加えた「ECCM1」培地
- 第一培地交換後に更に増殖・重層化を促進するため、上記 ECCM1 に上皮細胞成長因子（EGF）を追加した「ECCM2」培地

の 2 種類が必要である。

下表 7 に ECCM（1 および 2）培地を当社で調製した場合に用いる各種添加因子と、それらの国産試薬への切り替えの可能性を調査した結果をまとめる。

表 7　ECCM 培地用添加因子の切り替え計画

原料・試薬名	切り替え可否検討
ウシ胎児血清（FBS＝Fetal Bovine Serum）	本事業のために新規に FBS のロット選定試験を行い（社内試験 TAL-0154）、BSE リスクが極めて低いとされるオーストラリア産の FBS を調達した（FBS ロット# 53301102, Moregate Biotech）。 →　GMP 製造には更にウイルス不活化を求めるため、同一ロットを日本照射サービス（株）でガンマ線照射滅菌したものに切り替える。
Isoproterenol	Hospira 社の医薬品（Isuprel™）を用いているが、海外輸入品であり供給が安定しない。 →　国産の医薬品に切り替える（プロタノール®L、興和創薬（株））。
EGF（ECCM2 の調製のみ）	Austral Biologicals Inc.の EGF を用いているが、研究用試薬として無菌性の保証がなく、活性の安定性に懸念がある。 →　国産で大量供給が可能であり GMP 準拠の製造の下で一定の品質が保証されている Animal-free、GMP グレード試薬に切り替える（hEGF recombinant、ヒゲタ醤油（株））。
Selenium	Sigma-Aldrich Co. LLC.の研究用試薬を用いているが、現在国内で

（亜セレン酸ナトリウム）	入手可能な医薬品は販売されていない。 →　現時点では研究用試薬を継続して使用する。国内で医薬品として開発中ではあるので（藤本製薬（株）がフェーズ III 治験実施中）将来的には切り替えが可能か引き続き調査する予定である。
T3 (3,3,5-triiodo-L-thyronine sodium salt)	Sigma-Aldrich Co. LLC.の研究用試薬を用いているが、現在国内で入手可能な医薬品は販売されていない（武田製薬（株）の医薬品があるが、錠剤なので培地調製には使えない）。 →　現時点では研究用試薬を継続して使用する。将来的には切り替えが可能か引き続き調査する予定である。
Hydrocortisone	既存で国産の医薬品を用いている（サクシゾン®、テバ製薬（株））。 →　切り替え無し。
Insulin	元は米国企業の医薬品だが、国内の製造販売子会社によって普及されている（ヒューマリン®R、日本イーライリリー（株））。 →　切り替え無し。
Penicillin G	既存で国産の医薬品を用いている（ペニシリンGカリウム、明治製菓（株））。 →　切り替え無し。
Streptomycin	既存で国産の医薬品を用いている（硫酸ストレプトマイシン、明治製菓（株））。 →　切り替え無し。
Amphotericin B	元は米国企業の医薬品だが、国内の製造販売子会社によって普及されている（ファンギゾン®、ブリストルマイヤーズ（株））。 →　切り替え無し。

上表 7 において今回切り替えの検討が必要であると判断した主な培地添加因子は FBS、Isoproterenol、EGF の 3 種である。①国内でガンマ線照射滅菌した FBS を用いた培地、②Hospira Inc.の Isuprel™を興和創薬(株)のプロタノール®L に切り替えた培地、③Austral Biologicals Inc.の EGF をヒゲタ醤油（株）の GMP グレード EGF に切り替えた培地のそれぞれにおいて、口腔粘膜上皮細胞シートの培養における性能を、コントロールとした従来培地（現行 ECCM 培地）と比較した。

評価には各培地を用いて、ウサギの口腔粘膜上皮細胞シートを作製し（各種培地につき 2 枚ずつ）、シート形成能（培養工程が完了したシートの剥離成功率、完全性、透明性の評価）およびコロニー形成率（高い増殖能を持つ幹細胞又は前駆細胞の比率の指標）を検討した。

下表 8 に結果の概要を示す。

表 8　ECCM 培地用添加因子の切り替え検討結果

培地名	現行 ECCM	ECCM/γ-FBS	ECCM/Proternol	ECCM/Higeta EGF
組成概要	既存の組成で当社にて調製したコントロール培地	FBS を国内でガンマ線滅菌した FBS に切り替えた培地	Isuprel™を興和創薬のプロタノール®L に切り替えた培地	EGF をヒゲタ醤油の GMP グレード EGF に切り替えた培地
ウサギ細胞シート形成能	合格	合格 （現行 ECCM と同等）	合格 （現行 ECCM と同等）	合格 （現行 ECCM より角化が少なく、透明性が高い）
ウサギ細胞コロニー形成率	0.51% ±0.02%	0.53% ±0.04% （現行 ECCM と同等）	0.61% ±0.02% （現行 ECCM より有意に高い）	0.55% ±0.06% （現行 ECCM と同等だが、コロニーサイズが大きい）

ガンマ線滅菌済み FBS、プロタノール®L（興和創薬）、EGF（ヒゲタ醤油）を用いたそれぞれの培地は、既存の組成の培地と同等又はそれ以上の性能であることが示された。

・FBS は、ガンマ線照射の有無による違いは見られなかった。よって、ガンマ線照射済みの FBS を用いることで、より高い安全性の担保が可能になる。

・プロタノール®L（興和創薬）は、現行の Isuprel™（Hospira）よりも高いコロニー形成率が得られた。これはメーカーによる製造方法やラセミ特性の違いにより、幹／前駆細胞の維持効率が向上する可能性が示唆された。

・EGF（ヒゲタ醤油）は、図 8、図 9 に示すように、重層上皮細胞シートの角化の減少（透明性の向上）及びコロニーサイズの拡大が認められた。EGF は未分化上皮細胞の増殖能と遊走を促進するので、安定して高い活性度が保証されているヒゲタ醤油の GMP グレード EGF を導入することにより、品質の向上が得られると考えられる（研究用試薬の EGF は、メーカーやロットにより保障されている活性度が数倍低いことがある）。

現行 ECCM　　ECCM/Higeta EGF

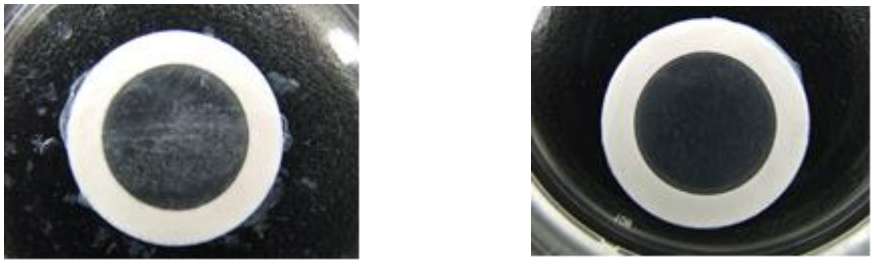


図 8　細胞シート写真例

現行 ECCM　　ECCM/Higeta EGF

図 9 コロニー形成アッセイ写真例

本試験結果から、FBS、Isoproterenol、EGF の 3 種の添加因子の切り替えが可能であったことから、供給の安定性だけでなく安全性、及び品質の向上が期待できることが示唆された。次の段階として、これらの添加因子を同時に導入した培地を国内 C 社にて試作し評価を実施し、GMP 準拠下での大量生産に向けた培地キットの製造検討を実施した。

実施結果（国内 C 社特注培地の同等性検討試験）

これまで用時調製を行っていた専用培地を GMP に準拠した工場にて大量調製することで安定供給を図ることができ、培養工程の簡素化が可能となる。またそれは再生医療製品の品質向上に寄与する。

そこで、国内にて GMP 準拠の製造施設を有する国内 C 社に当社指定の培地試作を外注した。試作においては下記 2 種類の培地を依頼し、同時検討を行った。

① 国内 C 社試作 ECCM Version A：

前項において新規に選定した添加因子の切替品（国内でガンマ線照射滅菌した FBS、プロタノール（興和）、GMP グレード EGF（ヒゲタ醤油））を採用した組成をもとに、CAOMECS の培養に必要な ECCM 培地を試作した。基礎培地においては、当社で調製する場合、米国 Invitrogen 社の DMEM-GlutaMAX および Ham's F12 の液体培地を用いていたが、それらは少量のボトルでしか販売されていないため大量生産には向いていない。よって国内 C 社での試作には、Sigma 社の粉体培地を GMP 規格の精製水で溶解し、組成を合わせるために L-alanyl-L-glutamine および Sodium pyruvate を添加したものを用いることとした。なお、別途小分け包装の EGF を用時添加することで、製造工程の段階により ECCM1（EGF 不含）又は ECCM2（EGF 含有）を使い分けることを可能にした。

② 国内 C 社試作 ECCM Version B：

既存の ECCM 培地には毒物指定されている亜セレン酸ナトリウムを酸化防止剤として微量添加している。極力有毒物質は除外したいため、亜セレン酸ナトリウム不含の ECCM 培地を試作し、データ採取のために同時に評価を行った。

図 10　国内 C 社の試作培地

最初に試作した Version A、及び Version B の培地を用いて、ヒト口腔粘膜上皮細胞シートの培養における性能を当社で調製した培地（CS 現行 ECCM）と比較した結果（表 9）、細胞シートの形成が遅れ、損傷なく培養容器から剥離することが不可能であり（図 **11**）、コロニー形成率も減少することが示された。更に培養 10 日目頃から NIH/3T3 フィーダー細

胞の激しい劣化が見られ、特に ECCM Version B において広範囲（半分以上）に細胞が培養容器から剥がれ、溶解してしまっていることが確認された（図 **12**）。

調査の結果、1 回目の試作では培地製造時に計算ミス、及び試薬の取り違えがあったことが判明した。具体的には培地の水量にミスがあり、浸透圧が変わっていたこと、指定とは異なるグレードの EGF を用いていたことが確認されたため、当該培地を再試作し試験を繰り返した。

表 9　試作培地の試験結果：第 1 回目試作

培地名	CS 現行 ECCM	国内 C 社 試作 ECCM Version A	国内 C 社 試作 ECCM Version B
組成概要	既存の組成で用時調製したコントロール培地	国内 C 社試作培地、亜セレン酸含有	国内 C 社試作培地、亜セレン酸不含
浸透圧	320 mOsm/Kg	287 mOsm/Kg	282 mOsm/Kg
ヒト細胞 シート形成能	合格	不合格 コンフルエント到達日の遅延 剥離困難、シート損傷	不合格 コンフルエント到達日の遅延 剥離困難、シート損傷
ヒト細胞 コロニー形成率	3.8 % ±0.4%	2.8 % ±0.2 % 現行 ECCM より低い（有意差あり）	3.0% ±0.2% 現行 ECCM より低い（有意差あり）
フィーダー細胞	正常	一部劣化	大幅に劣化、 細胞溶解

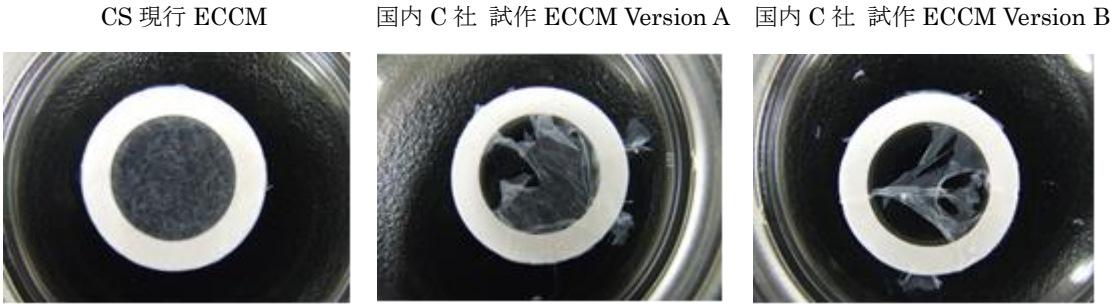


図 11　試作 1 回目：細胞シート剥離後写真例

CS 現行 ECCM　　国内 C 社 試作 ECCM Version A　　国内 C 社 試作 ECCM Version B

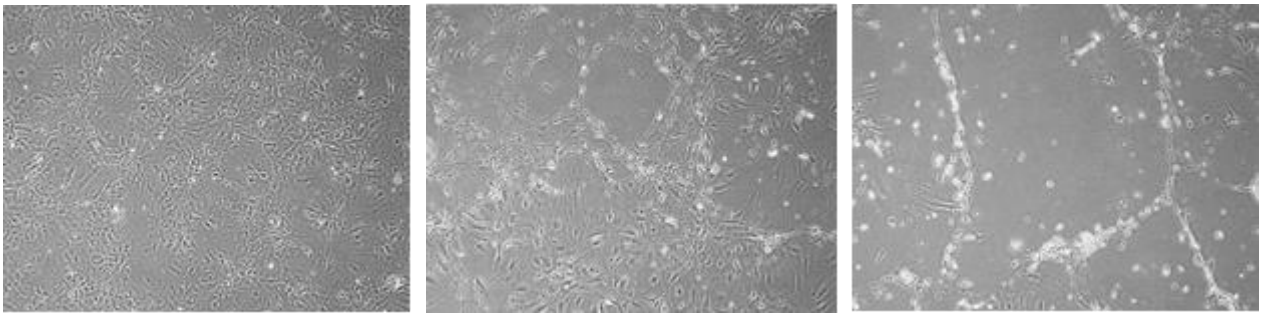


図 12　試作 1 回目：NIH/3T3 フィーダー細胞への影響（11 日目、40x 倍率）

2 回目の試作培地を評価した結果、浸透圧および EGF のグレードを修正したにも関わらず（表 10）、シート形成が不合格となりコロニー形成率の減少およびフィーダー細胞の劣化が見られた。なお、より厳密な比較を実施するために、試作培地と同様に FBS-Isoproterenol-EGF の 3 因子を切り替えた組成にて、新たに当社で用時調製した培地（CS 新 ECCM）も同時に評価を行った。その結果、コロニー形成率は現行培地（CS 現行 ECCM 培地）と同等であったが、シート形成は不合格となり、培養 12 日目においてフィーダー細胞に若干の劣化が見られた（試作培地 Version A と同等程度）。

表 10　試作培地の比較試験結果：第 2 回目試作

培地名	CS 現行 ECCM	CS 新 ECCM	国内 C 社 試作 ECCM Version A	国内 C 社 試作 ECCM Version B
組成概要	既存の組成で用時調製したコントロール培地	FBS-Isoproterenol-EGF をそれぞれ新規代替品に切り替え用時調製した培地	国内 C 社 試作 ECCM、亜セレン酸含有	国内 C 社 試作 ECCM、亜セレン酸不含
浸透圧	320 mOsm/Kg	n.d.	313 mOsm/kg	313 mOsm/kg
ヒト細胞シート形成能	合格	不合格（剥離困難、シート損傷）	不合格（剥離困難、シート損傷）	不合格（剥離困難、シート損傷）
ヒト細胞コロニー形成率	5.3 % ±0.3%	5.0 % ±0.2%（現行 ECCM と同等、コロニーのサイズが大きい）	4.3 % ±0.0%（現行 ECCM より有意に低い、コロニーのサイズが大き	3.7 % ±0.4%（現行 ECCM より有意に低い、コロニーのサイ

			い)	ズが大きい)
フィーダー細胞	正常	一部劣化	一部劣化	大幅に劣化、細胞溶解

これらの結果（表 10）から、それぞれの培地の性能について以下の通りに考察する：

- 2 回目の試作培地でも 1 回目と同様の性能低下を示したため、当初の水量（浸透圧）と EGF グレードの誤りは主な原因ではなかったことが示唆される。

- 試作培地と用時調製培地において、FBS-Isoproterenol-EGF の 3 因子を新規代替品に切り替えた結果、シート形成能の低下およびフィーダー細胞の劣化が認められた。
  前項の試験でそれぞれの因子を個々に切り替えて作製した培地でウサギ口腔粘膜上皮細胞シートの形成能を評価した場合にはそのような現象は認められなかったので、3 因子の組み合わせに問題があるか、ウサギでなくヒトの口腔粘膜上皮細胞特有の原因があると考えられる。そのためウサギ細胞を用いた再検討が必要であり、フィーダー細胞を用いたより精密な評価も必要となる。

- 試作培地においては、いずれの用時調製培地と比較してもコロニー形成率が低いことが示された。よって上記 3 因子とは更に別の要素が関わっている可能性がある。例えば、DMEM-Ham's F12 の混合基礎培地のメーカーおよび製造法を変更したことが考えられる。

- フィーダー細胞の劣化は、1 回目および 2 回目の試作共に Version B（亜セレン酸不含）の培地で激しいことが認められた。亜セレン酸は抗酸化物としての保護的な役割を持つため、除外することで細胞死が促進したと考えられる。

本試験によって CAOMECS の培養は培地の品質やわずかな組成の違いに大きく影響されることが示唆された。より精密な調査・開発を行わなければ、GMP 大量生産培地への切り替えは難しいと考える。

総括

再生医療等製品の有効性を判断するにあたり、これまでの医薬品、医療機器のような偽薬投与、偽手術が事実上、倫理上難しいことから、より客観性のある有効性の指標を設定する必要がある。当社が開発を進めている角膜上皮幹細胞疲弊症（LSCD）に対する自己口腔粘膜上皮細胞シート（CAOMECS）による再生医療は、自己角膜由来細胞を用いた方法に比べ、口腔粘膜上皮細胞を用いることから両眼性の患者にも適用でき、かつマウス由来のフィーダー細胞を最終製品に混入することがない製造方法であるため、類似の自己組織由来の再生医療より優位性は高いと考えている。そのことからも薬事承認を迅速に得るためには有効性を明確に示す手段が重要である。

今回、LSCD 患者の QOL を低下させている原因のうち、特に資格に影響する視軸上への血管侵入、および角膜上皮の欠損（結膜化）を再生医療により治療した際の有効性を評価するにあたり、これまで医師の主観的なグレーディングに頼っていた現状を、画像解析により客観的にその有効性を評価しうる方法を検証した。結膜化を含む角膜上皮欠損の定量化は今回検証した方法論で有効に機能することが示唆された。また、血管新生に対しても本手法が適応の可能性は確認されたが、微細血管に特有の大小さまざまな径の血管が分岐をもって存在しているため、定量化にはスリットランプの撮影条件の最適化や血管径、分岐度の更なる定量化の方法論の検討が必要であることが示された。しかし、これらは条件検討を重ねることで解決するものと考えられ、本アプローチは臨床評価の有効性判断に適応できる方法論であると考えられた。

また、当初計画である、煩雑な手作業が強いられる細胞培養が必要な再生医療等製品の製造を省力化、かつ製造ミスの回避が見込まれる培養工程の一部自動化を検討するにあたり、先ずその前提条件である供給（入手性）を含めた安定な再生医療等製品の製造工程の検証を実施した。そのうち、CAOMECS 製造に必要なフィーダー細胞（マウス繊維芽細胞）の供給安定性に必要なセルバンクの国内構築を検討したが、残念ながら今回調査した範囲では国内に要求事項を満たしうる企業を見出すことはできなかった。そのため、海外にその工程を委ねざるを得ないが、日本の再生医療の推進にはセルバンクを自前で製造するリソースがないベンチャー企業等が委託できる、マイトマイシン処理等の特殊な作業を含め、受託できる企業の存在が求められる。

さらに、同じく海外に供給を委ねることの多い、細胞培養に必要な培地等資材に関しても供給安定性を担保するために国産化する必要性がある。本検討では、国内の GMP 準拠の工場を有する培地製造企業に対し、培地原料の供給安定が見込める培地成分・添加因子を用いた培地の試作を外注し、これまで自社で煩雑な作業を伴う培地の大量調製を試みたが、培地組成通りに調合しても、自社調製培地の性能を再現できなかった。また、添加因子のメーカーを国産に切り替えるだけでも、製品性能に予想以上の差が出てしまうことも確認された。これらのことから、組成が同一であっても用いる薬品類の製造元が変わるだけでも

CAOMECS が安定に製造できないことが意に反して確認された。このことを鑑みると、再生医療製品は開発の初期段階から大量生産を踏まえた工程・製品設計を、培地等を含めた消耗品類に対しても同時に検討する必要性があり、低分子医薬品ではなく抗体医薬等の開発に倣うことが重要である。

しかし、これらの問題点を克服することが日本の再生医療実用化の促進に繋がることは明らかであり、多くの再生医療シーズに対して、主導企業のみならず、周辺企業（セルバンク製造、専用培地製造等）の更なる成熟が望まれる。

以上