

平成 28 年度

再生医療の産業化に向けた評価基盤技術事業

(再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発)

事業報告書

事業名	再生医療の産業化に向けた評価基盤技術事業 (再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発)
研究開発課題名	再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発
研究開発代表者 所属 役職 氏名	国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 創薬資源部 部長 松山 晃文

目次

1. 事業の目的.....	1
2. 実施内容及び結果	1
3. 評価手法等の開発・製造工程合理化のための検討内容	17
4. まとめ.....	20

1. 事業の目的

本申請の目的は、当該再生医療等製品における生物学的同等性評価指標を示し、対面助言にて機構と合意することにある。中期的な波及効果として、cell-based bio-actives delivery を MOA とする製品における、開発相進展に際しての原料ロット差、原材料変更、製造工程改善により生じる規制面での不連続性を解消する手段を提示することとなり、同種再生医療等製品のスケールメリットを生かし、生物由来原料基準に対応できていない海外製品の治験への迅速な移行を促進すると想定される。長期的展望として、本研究は bio-similar / bio-generic における生物学的同等性の提示を射程に入れており、わが国再生医療産業の活性化と安価な再生医療の国民への提供に寄与する。

本事業で開発する再生医療等製品は肝線維症を適応とするヒト（同種）体性幹細胞加工再生医療等製品である。健常者より提供された皮下脂肪組織から単離培養した脂肪組織由来多系統前駆細胞を細胞原葉としている。その作用機序（Mode of Action; MOA）は cell-based bio-actives delivery であり、当該細胞の分泌する PGE2 による抗炎症作用、MMP-9 による肝線維溶解ならびに HGF による肝細胞再生作用である。

脂肪組織由来多系統前駆細胞を用いる肝線維症を適応とする再生医療等製品の開発において、原料ロット差、生物由来原料基準対応の原材料の規制対応、大量培養にむけた製造工程変更に対応し、薬事戦略相談対面助言を実施することが、喫緊の課題である。

本課題を解決するため、生物学的同等性評価 package を開発、それが実際に work するか、原料ロット差、原材料変更、製造工程改善による影響を検証し、生物学的同等性評価手法として提示する。

2. 実施内容及び結果

2-1. 有効性の観点から見た同等性評価手法の提案と検証

本剤のような cell-based bio-actives delivery では、有効性からみた同等性は MOA に寄与する bio-actives を指標とすると想定、具体的には肝線維症の改善に寄与する MMP-9、HGF、PGE2（合成酵素）が評価に用いるかを検定、特に PGE2 合成酵素である Cox-2 はその発現が安定しており、同等性評価の指標として採用可能であり、MMP-2 および MMP-3 を追加することで同等性を評価することとした。MMP-9 については同一条件で製造した ADMPC でのばらつきを、同等性の許容範囲とすることとした。HGF については probe 問題があると想定され、同等性評価に採用するためには、array probe の再デザインが必要であると帰結にいたった。

IVIVC（*in vitro* - *in vivo* correlation）に焦点をあてて研究を実施した結果、四塩化炭素反復投与線維化モデルラットおよび NASH モデルマウスへの細胞製剤の投与の成績から、IVIVC を反映する同等性/同質性評価項目として、当初想定していた MMP-9、HGF、Cox-2 ではないとの成果が得られた。同等性/同質性担保の許容範囲として、cell-based bio-actives delivery である本開発細胞製剤では、下限閾値のみが設定可能であることが明らかとなった。

2-1-1. intra assay deviation・inter assay deviation の検定

製造工程に変更が加えられない場合の MMP-9、HGF、PGE2 合成関連酵素 Cox-2 のばらつきを検定した。

GeneSymbol	Lot.1-1	Lot.1-2	Lot.1-3	Lot.1-4	Lot.1-5	Lot.1-6
COX2	6.827	7.039	7.121	6.760	7.066	7.082
MMP9	5.128	5.143	5.106	5.004	5.009	5.075
HGF	-0.914	-1.106	-0.833	-0.610	-0.703	-1.642
HGF	-0.039	-0.350	-0.035	0.158	0.156	-0.995
GAPDH	8.558	8.376	8.338	8.408	8.403	8.467
MMP2	4.050	4.250	4.105	4.180	4.109	4.461

同一ロット同時製造の 6 枚の 10cm dish から回収した total RNA を array にて解析した結果である。各々の数値は probe 蛍光の対数表示 (Log 表示) である。HGF の 2 probe のうち、上の probe については、1-6 を削除することで評価が可能となる。一方、下の probe に関しては array 毎のばらつきが大きく、これを同等性評価に適用することは困難である。一方、Cox-2、MMP-9、MMP-2 および house keeping gene である GAPDH は安定しており、mean±15%であることが確認された。

2-1-2. 同等性評価への適用可能性の検証・同等性担保の許容範囲設定

回収した複数ロットについて total RNA を array にて解析し PGE2 合成関連酵素 Cox-2、MMP-9、HGF、MMP-2、GAPDH の定量的評価を行った。各々の数値は probe 蛍光の対数表示 (Log 表示) である。

	Lot1	Lot2	Lot3	Lot4	Mean	Mean-25%	Mean+25%
COX2	6.983	6.399	6.340	6.893	6.654	4.990	8.317329
MMP9	5.078	3.050	3.030	0.503	2.915	2.186	3.643865
HGF	-0.833	-1.091	-1.084	0.008	-0.750	-0.562	-0.93749
GAPDH	8.425	8.277	8.501	8.282	8.371	6.278	10.46416
MMP2	4.192	4.136	4.029	3.510	3.967	2.975	4.958596
MMP3	4.353	5.289	1.994	3.090	3.682	2.761	4.601931

有効性評価を目的とする出荷規格として採用している Cox-2、MMP-9、HGF について mean±25%に入る lot を見ると、Cox-2、MMP-2、MMP-3 は全てのロットが想定範囲に入る。一方、MMP-9 および HGF に関しては、lot4 が lot1~3 から deviation を認めた。

有効性からみた同等性評価指標として、MOA を反映する項目を定量的に評価し、mean±15%をメルクマールとすることで同等性を示すことは可能であるとの帰結に至り、平成 28 年度のマイルストーンは達成した。ただし、同じ製造方法でも同等性を示しえないロットがでてくことは念頭に置かねばならない。

2-1-3. IVIVC の検証可能性の検討

肝内での投与細胞の bio-actives 発現の検証が同等性・治療学的同等性評価に用いようと想定し、検証を進めた。これら bio-actives は intrinsic にも分泌されるため、肝臓 whole での評価はできない。そこで、IVIVC (*in vivo-in vitro* correlation) の観点から、簡便かつ安価で信頼性のある *in vitro* での理化学的な評価手法として bio-actives の定量的 PCR を、*in vivo* (ヌードマウスおよびヌードラット) 肝臓でのヒト特異的 Probe を用いて IVIVC (*in vivo-in vitro* correlation) を検証することとし、多くの primer design を行ったが、similarity が低くヒトに特異的であると想定された probe を

図細胞 A と細胞 B は、ともにコントロール群よりも有意に線維化が抑制されていたが、両群間に線維化領域にて統計的有意差は得られず、これは四塩化炭素モデルでの成績を再現するものであった。四塩化炭素モデルでの成績、およびこの成績から、hADMP が産生する bio-actives である MMPs の細胞特性指標基準 (*in vitro*) の幅には下限値のみの考慮でよく、その下限閾値以上であれば *in vivo* での有効性を担保しうる同等性/同質性指標であると想定された。

IVIVC 評価指標では、*in vitro* と *in vivo* での評価が相関する必要がある。ここまでの試験で解析した細胞は投与前の細胞であり、投与後に生体（肝臓）内で IVIVC の指標が変化していないこと、つまり同等であることを確認することとした。

経静脈的に細胞製剤が投与された四塩化炭素反復投与慢性肝傷害ラットの肝臓（day0, 1, 5, 10, 14）より MACS system（ヒト CD90 抗体）にて回収された細胞の提供を受け、RNA を回収、DNA micro array に供し経時的に比較した（動物試験については 2-3. 参照）。

IVIVC の指標とは、経静脈的に投与した細胞において *in situ* にて大きな細胞特性変化は認められない。これら成績から、作用を予測させる直接的 IVIVC 評価項目として採用することとした。

再生医療等製品事前面談（2016 年 10 月）

表題 製造方法変更および同等性の考え方について

〔質問事項〕

1. ヒト（同種）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針（以下「指針」）

「第 2 章 第 2 7 製造方法の変更」の項によれば、「開発途中に製造方法を変更した場合、変更前の製造方法による製品を用いて得た試験成績を治験開始時又は承認申請に使用するとき、製造方法変更前後の製品の同等性／同質性を示すこと。」とある。

1) 本製品は、ヒト皮下脂肪組織を原料として用いる再生医療等製品であるが、脂肪塊として提供される場合と脂肪吸引（ドロドロした液状）にて提供される場合がある。脂肪塊試料から脂肪吸引試料へと変更した場合、はさみ等を用いた細切の工程が加わることとなる。この場合、製造方法の変更にあたるのか、機構の見解を伺いたい。

2) 細胞の培養過程でフラスコや培養皿が用いられる。それらの面積が変わると、細胞が（サブ）コンフル状態となるまでの倍加数が異なることとなる。製造方法の変更にあたるのか、機構の見解を伺いたい。

3) 細胞の培養工程を少量用手培養から大量培養系に変更した場合、製造方法の変更にあたるのか、機構の見解を伺いたい。

4) これら 1) ～ 3) の議論を踏まえた上で、示すことが求められる製造方法変更前後の製品の「同等性／同質性」に関し、その定義について機構の考えを伺いたい（「同等性/同質性」とは何であり、どのように示すべきか、という方向性を伺いたい）。

2. ヒト（同種）体性幹細胞加工再生医療等製品の製造方法の変更を行うと「同等性／同質性」の提示が求められる。

1) 1-4) にて議論のとおり、「同等性／同質性」の提示は「細胞数、細胞生存率並びに製品の使用目的及び適用方法等からみた特徴が、製造方法の変更により本質的に損なわれない」ことを示すことで足るか、機構の見解を伺いたい。

2) 「同等性／同質性」の提示にあつて、相談者らは前述の「細胞数、細胞生存率並びに製品の使用目的及び適用方法等からみた特徴」のうち「製品の使用目的及び適用方法等からみた特徴」に関し、「ヒト同種幹細胞指針 第2章 第3 最終製品の品質管理」記載項目のうち、製品の使用目的及び適用方法等からみた特徴を示すための項目として 9 効能試験に着目し、いくつかの有効性物質の発現量ばらつきが一定範囲に入れば、「同等性／同質性」を示しうると考えている。機構の見解を伺いたい。

PMDA の見解

1. 原料の採取方法の変更、培養に用いる培養皿等の面積の変更、培養スケールの変更は、全て製造方法の変更にあたる。製造方法変更前後の同等性評価においては、規格試験に限らず評価すべき項目を慎重に判断すべきであり、非臨床試験や臨床試験による確認の要否について検討する必要がある。

2. 同等性/同質性の評価においては、細胞数、細胞生存率及び Mode of Action に寄与するサイトカイン等の産生能は有用な情報となる。

PMDA 見解に伴う、本研究事業での対応

Mode of Action に寄与するサイトカイン等を個別に評価するのみならず、細胞特性の同等性評価項目として DNA array を採用し、検討を加えることとした。

細胞特性の評価として DNA array による相関係数評価を考案、事前面談・対面助言に向けて研究をおこなっている。(成果は下記)

intra assay deviation・inter assay deviation の検定 (2-1-1.)

DNA array による同等性評価を想定し、intra assay deviation の評価として、まず Cy3 ラベル化 cRNA 合成まで同一条件としたテクニカルレプリケートによる再現性の確認を行った。各サンプルの総当りでの Correlation 解析 (アルゴリズム : Pearson Correlation) を行い、各サンプル総当りでの相関係数 (R 値) を算出した。1-1~1-4 および 2-1~2-4 は各々同一 array slide 上にて試験を行い、array slide 間での deviation も同時に検討した。

表 1. 各サンプルの総当たりでの相関係数

	[1-1]	[1-2]	[1-3]	[1-4]	[2-1]	[2-2]	[2-3]	[2-4]
[1-1]	1.000	0.991	0.990	0.992	0.991	0.987	0.989	0.988
[1-2]	0.991	1.000	0.998	0.998	0.997	0.997	0.997	0.997
[1-3]	0.990	0.998	1.000	0.998	0.998	0.998	0.998	0.997
[1-4]	0.992	0.998	0.998	1.000	0.998	0.997	0.997	0.997
[2-1]	0.991	0.997	0.998	0.998	1.000	0.997	0.997	0.997
[2-2]	0.987	0.997	0.998	0.997	0.997	1.000	0.998	0.998
[2-3]	0.989	0.997	0.998	0.997	0.997	0.998	1.000	0.997
[2-4]	0.988	0.997	0.997	0.997	0.997	0.998	0.997	1.000

図 1 各サンプルの総当たりでの相関係数を示したヒートマップ表示

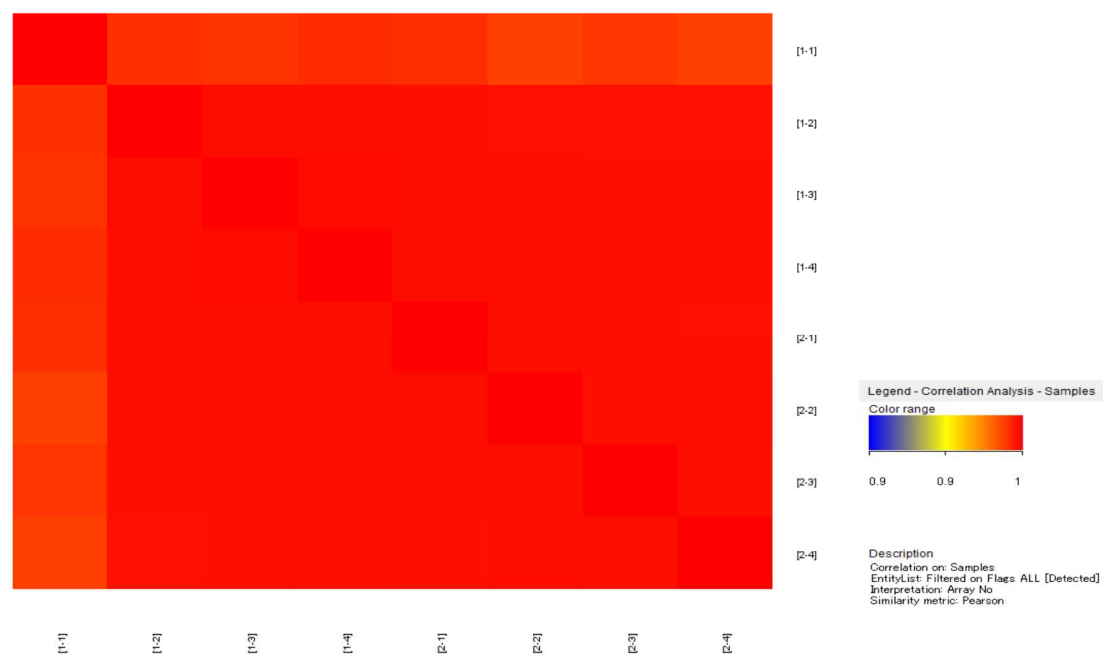
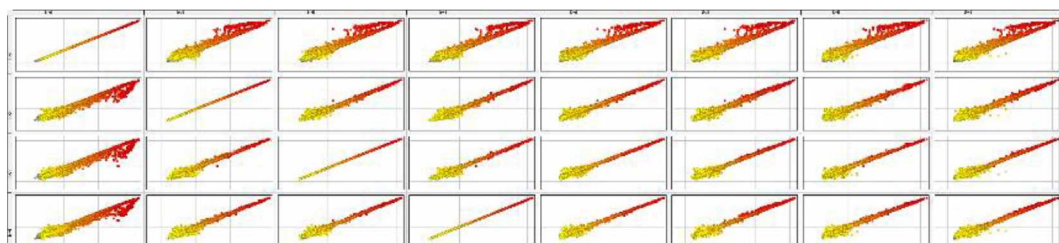
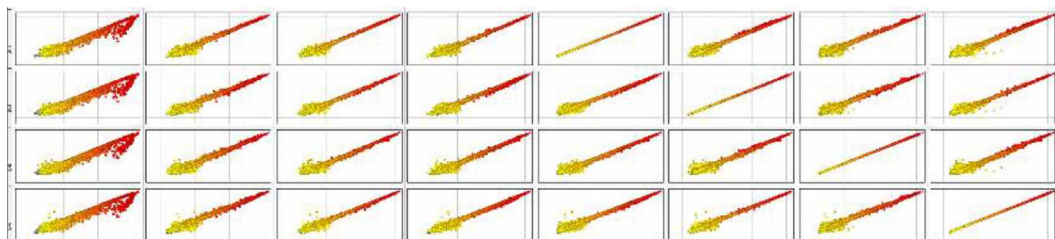


図 2. 各サンプル総当たりでの Scatter Plot (Matrix Plot) 表示





Lot1-1 のばらつきが大きいですが、これは array の作りこみにおける deviation と判断した。これは、同等性を示せないと判断される deviation があっても、試験試薬の問題を否定できないことを示しており、同等性を評価するに当たって、同じ試料を少なくとも 3 trials は array にかける必要があることを示唆している（いわゆる 2 勝 1 敗以上と判断できるように）。

次いで、total RNA を 8 alicot に分注し、array そのものにある deviation に加え、手技による deviation を考慮して、同等性を評価するために許容される手法であるかを検討した（スタート Total RNA サンプルを同一条件としたテクニカルレプリケートによる再現性の確認）。各サンプルの総当りでの Correlation 解析（アルゴリズム：Pearson Correlation）を行い、各サンプル総当りでの相関係数（R 値）を算出した。

表 2. 各サンプルの総当りでの相関係数

	[A8-	[A8-	[A8-	[A8-	[A8-	[A8-	[A8-	[A8-Lot. 1-
[A8-	1.000	0.998	0.998	0.995	0.998	0.997	0.997	0.996
[A8-	0.998	1.000	0.999	0.997	0.998	0.997	0.997	0.997
[A8-	0.998	0.999	1.000	0.996	0.998	0.997	0.998	0.997
[A8-	0.995	0.997	0.996	1.000	0.995	0.994	0.995	0.996
[A8-	0.998	0.998	0.998	0.995	1.000	0.998	0.998	0.997
[A8-	0.997	0.997	0.997	0.994	0.998	1.000	0.997	0.997
[A8-	0.997	0.997	0.998	0.995	0.998	0.997	1.000	0.997
[A8-	0.996	0.997	0.997	0.996	0.997	0.997	0.997	1.000

図3 各サンプルの総当たりでの相関係数を示したヒートマップ表示

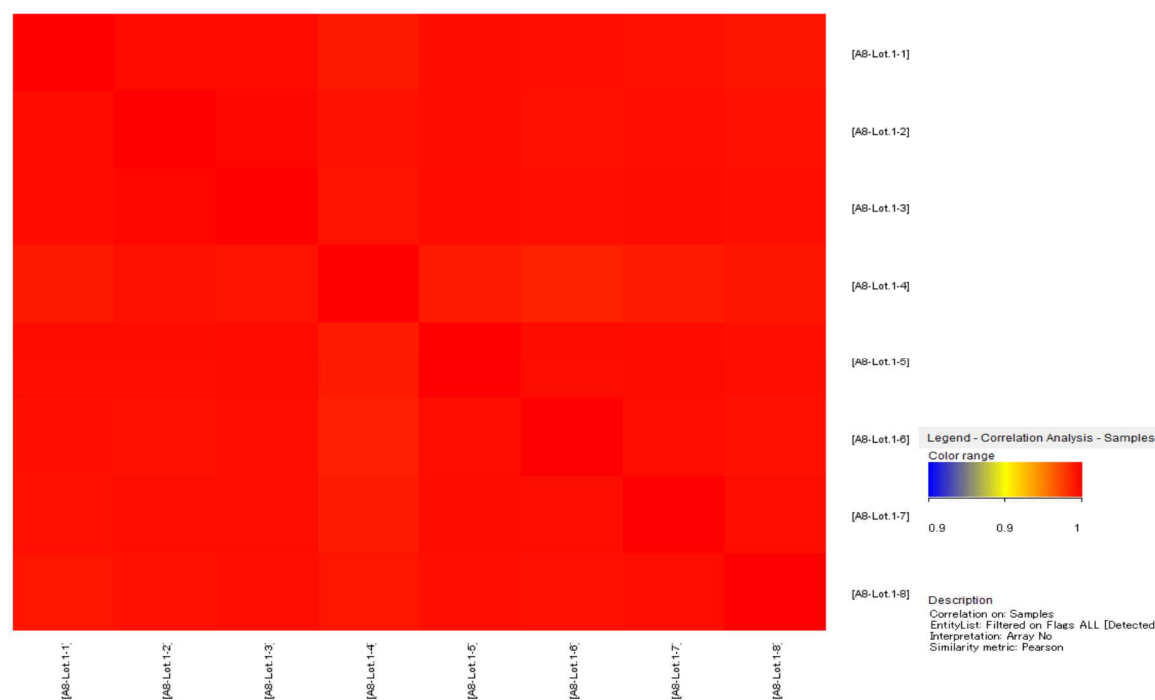
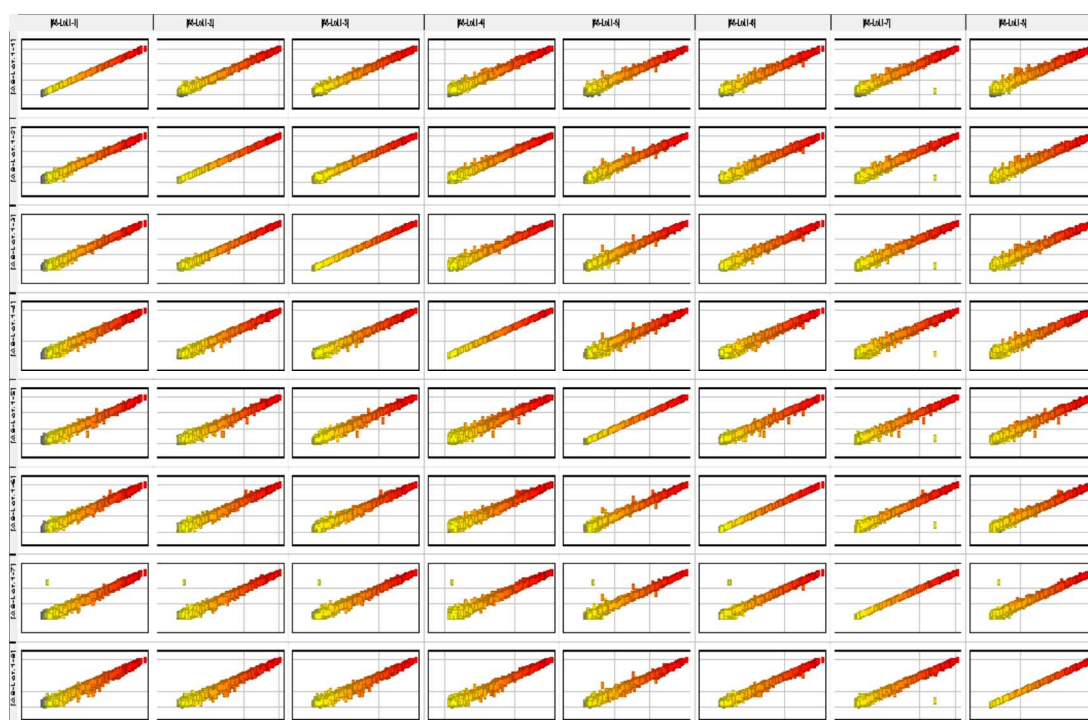


図4. 各サンプル総当たりでの Scatter Plot (Matrix Plot) 表示



相関係数は0.994以上であり、ヒートマップ上ではほぼ差を認知し得ず、手技による deviationa は、同等性評価にあたって許容される範囲であると考えた。一方 Scatter Plot (図4) では、ばらついている (直線から離れている) plot も複数ある。これは array そのものによる deviationt と想定される。

ここまでは、array 試薬・手技による deviation を検討してきた。次いで、同一ロットの同一製造ロット内のばらつき（10cm dish 間の再現性）について検討を行った（表 3～5）。

表 3. Lot. 1 における 6 枚の 10cm dish での総当たりでの相関係数

	Lot. 1-1	Lot. 1-2	Lot. 1-3	Lot. 1-4	Lot. 1-5	Lot. 1-6
Lot. 1-1	1.000	0.994	0.992	0.995	0.994	0.993
Lot. 1-2	0.994	1.000	0.996	0.997	0.996	0.996
Lot. 1-3	0.992	0.996	1.000	0.995	0.995	0.994
Lot. 1-4	0.995	0.997	0.995	1.000	0.997	0.996
Lot. 1-5	0.994	0.996	0.995	0.997	1.000	0.995
Lot. 1-6	0.993	0.996	0.994	0.996	0.995	1.000

表 4. Lot. 2 における 6 枚の 10cm dish での総当たりでの相関係数

	Lot. 2-1	Lot. 2-2	Lot. 2-3	Lot. 2-4
Lot. 2-1	1.000	0.997	0.996	0.996
Lot. 2-2	0.997	1.000	0.997	0.997
Lot. 2-3	0.996	0.997	1.000	0.997
Lot. 2-4	0.996	0.997	0.997	1.000

表 5. Lot. 3 における 4 枚の 10cm dish での総当たりでの相関係数

	Lot. 3-1	Lot. 3-2	Lot. 3-3	Lot. 3-4
Lot. 3-1	1.000	0.998	0.997	0.997
Lot. 3-2	0.998	1.000	0.996	0.997
Lot. 3-3	0.997	0.996	1.000	0.997
Lot. 3-4	0.997	0.997	0.997	1.000

同一ロット内でのばらつきとして相関係数の worst case は 0.992 であったことから、ロット間での相関係数は 0.992 程度までは許容されると思われる。

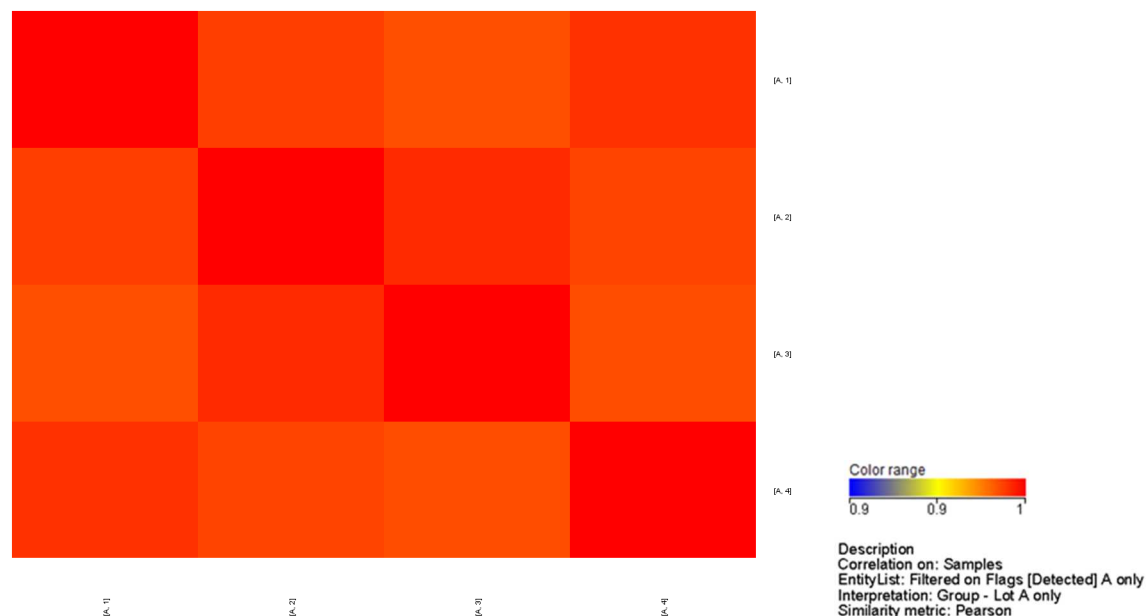
同等性評価への適用可能性の検証・同等性担保の許容範囲設定（2-1-2.）

ロット間差について、DNA array による相関解析を行った。4 line の異なったドナー由来の脂肪組織由来多系統前駆細胞について各サンプルの総当たりでの Correlation 解析（Pearson）を行い、相関係数（R 値）を算出した。

表 6. 4 ロット総当たりでの相関係数

	Lot. 1	Lot. 2	Lot. 3	Lot. 4
Lot. 1	1. 000	0. 988	0. 985	0. 990
Lot. 2	0. 988	1. 000	0. 992	0. 987
Lot. 3	0. 985	0. 992	1. 000	0. 985
Lot. 4	0. 990	0. 987	0. 985	1. 000

図 5. 4 ロット総当たりでの相関ヒートマップ



全てのロットは同一ロットの試薬にて培養され、第4継代にて凍結されていたものを解凍後2継代してarrayを実施しているため、GCTPの考え方からすると「同一」であるが、ヒートマップからはばらつきを認める。その中でも、lot2とlot4はかなり近似した細胞特性を有する。実際、lot1は腋窩脂肪組織由来、lot4は下腿脂肪由来であるのに対し、lot2およびlot3は腹部皮下脂肪由来の脂肪組織由来多系統前駆細胞である。Lot2とlot3はお互いに相関係数が0.992である。

Intra assay deviationおよびinter assay deviationの検討結果から、相関係数が0.992までは同一ロット（同時製造同一ロット）でもばらつきがあることから、相関係数0.992までは少なくとも同等性を否定できないことから、少なくとも相関係数0.992までは同等性を示しえと考える。ただし、かなり厳しい同等性評価基準となっていると思われ、対面助言で提示することで、以後の同種由来再生医療等製品の開発の様多元にならないかとの危惧は有る。

2-2. 安全性の観点から見た同等性/同質性評価手法の提案と検証

安全性からみた同等性/同質性評価手法の策定のため、急性期の投与時の肺塞栓梗塞の risk が増加していないことを検証する。具体的には、細胞を懸濁した状態で放置した場合の細胞懸濁性を、同等性評価手法として開発することとした。しかしながら、細胞製剤の懸濁性を吸収活性で評価することは困難であった。

CRO 複数社に、光学吸光度により細胞凝集性評価系を有しているか調査したところ、1社の技術が本研究開発でのゴールと概ね同一であった。そのため、「安全性の観点から見た同等性/同質性評価手法の提案と検証」の項目に関しては平成 28 年度にて終了とし、CRO にて外部委託試験を実施することで細胞製剤の開発を進めることとした。

2-2-1. inter assay deviation の検定

細胞懸濁液（最終製品）の塞栓形成リスクを評価することが、本開発項目の目的である。そこで、当初の計画では、細胞の懸濁後どのタイミングで測定するかを明確にしていなかったため、懸濁後の細胞懸濁性について検討を加えた。細胞は懸濁基液よりも比重が大きいいため、時間経過とともに沈殿する。そのため、デキストランを加えない基液とデキストランを加えた基液に各々 ADMPC を懸濁し、懸濁性を検討した。

投与 dose と同じ細胞濃度で調製した ADMPC を alicot に 500 μ L ずつ分注、経時的に上層 100 μ L の細胞濃度と、再度転倒混和した後の細胞濃度を、細胞濃度を計測比較することで懸濁性を確認した。細胞の沈殿が認められなければ 100% となる。なお、目視上、ADMPc 細胞製剤においては、細胞の凝集は認められなかった。

	基液（デキストランー）			基液（デキストラン+）		
	上層 100 μ L 細胞濃度 (/mL)	転倒混和後 細胞濃度 (/mL)	上層 100 μ L 比率 (%)	上層 100 μ L 細胞濃度 (/mL)	転倒混和後 細胞濃度 (/mL)	上層 100 μ L 比率 (%)
0h	2.2 x 10 ⁶			2.3 x 10 ⁶		
1h	3.0 x 10 ⁴	2.2 x 10 ⁶	1.4	4.7 x 10 ⁵	2.1 x 10 ⁶	22.4
2h	1.0 x 10 ⁴	2.6 x 10 ⁶	0.4	8.0 x 10 ⁴	2.3 x 10 ⁶	3.5
3h	1.0 x 10 ⁴	2.4 x 10 ⁶	0.4	4.0 x 10 ⁴	2.3 x 10 ⁶	1.7
4h	<1.0 x 10 ⁴	2.7 x 10 ⁶	<0.4	4.0 x 10 ⁴	2.2 x 10 ⁶	1.8

投与 dose と同じ細胞濃度で調製した ADMPC を alicot に 500 μ L ずつ分注、経時的に上層 100 μ L の光吸収性（透過度）と、再度転倒混和した後の光吸収性（透過度）をを計測比較することで、懸濁性を確認した。細胞の沈殿が認められなければ 100% となる。なお、細胞の光吸収性（透過度）は、600nm にて測定した。

	基液（デキストランー）			基液（デキストラン+）		
	上層 100 μ L 細胞濃度 (/mL)	転倒混和後 細胞濃度 (/mL)	上層 100 μ L 比率 (%)	上層 100 μ L 細胞濃度 (/mL)	転倒混和後 細胞濃度 (/mL)	上層 100 μ L 比率 (%)
0h	0.075			0.050		
1h	0.002	0.065	3.1	0.013	0.086	15.1
2h	0.000	0.054	0.0	0.004	0.109	3.7
3h	0.000	0.050	0.0	0.004	0.061	6.5
4h	0.000	0.068	0.0	0.003	0.080	3.8

光透過度（吸収性）に関しては、細胞濃度測定の代替として使用されているが、我々の検討では計測値のばらつきが大きく、同等性評価項目として利用するには、一層の検討が必要であることが明らかとなった。安全性評価のためには、細胞の凝集性を評価することが必要であるため、細胞カウント時の細胞粒度分布を直接用いるほうが賢明かもしれない。平成 28 年度末までに、細胞粒度分布を同等性評価指標として提案できると考えている。

一方で、本試験からは、点滴静脈注射あるいは経血管的投与のように投与に時間を要する場合、細胞基液によって濃度の偏りが出るということが明らかとなった。例えば、乳酸リンゲルバッグに浮遊した場合、投与開始直後は目的の細胞濃度であるが、細胞の沈降により経時的に濃度が上昇し、peak out したのち細胞濃度が低下する、ということである。一過性であっても細胞濃度が上昇するということは、安全性試験では評価されていないことであるため、PMDA に情報提供のうえ議論する必要があり、本事業の成果として敷衍しうる。

2-3. 体内動態パターンによる同等性評価手法の提案と検証

安全性からみた同等性/同質性評価手法策定のため、細胞の体内動態の検証を行った。本研究開発細胞製剤である脂肪組織由来多系統前駆細胞は、ウイルス導入が困難であり、また PKH26 による細胞表面標識した細胞製剤をヌードマウスに経尾静脈的に投与したが、IVIS にて追跡できなかった。そこで、遠赤外線長波長蛍光色素である DiR を選択、最適化した手法に基づいて標識し、定性的な体内動態の評価に成功した。

2-3-1. IVIS を用いた肝臓及び肝臓以外の臓器への分布パターンの評価

製品の同一ロット細胞へのルシフェラーゼ遺伝子・蛍光蛋白質遺伝子の導入を試みたところ、脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC) にルシフェラーゼ遺伝子・蛍光蛋白質遺伝子などをウイルスにより感染させようとする、細胞の形態が変化し、その細胞特性の変化が同等であるとはいえないとの課題が表出した。この性質はヒト由来 ADMPC だけでなく、マウス由来 ADSC (型番 BBMUBMD01001, DS ファーマバイオ) でも同様であった。具体的には、マウス由来 ADSC (型番 BBMUBMD01001, DS ファーマバイオ) にて試みたルシフェラーゼ遺伝子導入法は、リポフェクション (Lipofectamine 3000, ViaFect Transfection Reagent, FuGENE HD Transfection Reagent の 3 種)、およびエレクトロポレーション (Gene Pulser, Bio-rad) で、pNLCoI3[luc2-P2A-NlucP/CMV/Hygro] Vector (プロメガ) を導入して Hygromycin B による選択する方法を試みたが、すべて導入されずに細胞死に至った。Hygromycin B への感受性が高い傾向が認められたが、これが細胞死の誘引となったと推測している。ウイルス感染させるとインターフェロン等が発現し、間葉系幹細胞はその細胞特性が変化してしまうと推測され、間葉系幹細胞の体内動態試験において、これらウイルスを用いた遺伝子導入技術はふさわしくないことが明らかとなった。

そこで、蛍光色素あるいは PKH26 のようなタンパク標識を試みた。PKH26 (Sigma) による色素標識では、細胞の追跡は不可能であった。PKH26 と同等の蛍光ビーズ (PKH26 リファレンスマイクロビーズ) ですら IVIS で非検出であった。PKH26 は IVIS 観察に適さないという結論にいたった。PKH26 については細胞の染色性が低く、細胞標識には不適であることが確認され、他の蛍光標識物質を検討した。

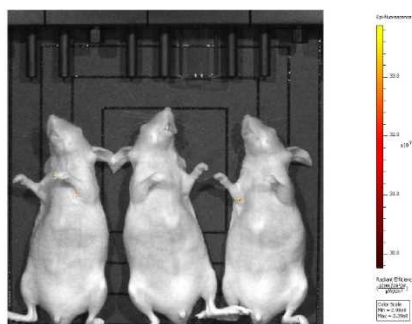


図 PKH26 でラベルしたマウス ADSC を投与したヘアレスマウスの IVIS による観察像

向かって左側が無処理対照マウス、中央および右側は PKH26 ラベルの ADMPC を投与したマウス。投与群でもまったく蛍光が見られなかった。

最終的には染色最適プロトコルを開発した DIR 染色法を選択、ADMPC を標識し、免疫不全げっ歯類に対して経尾静脈投与した。

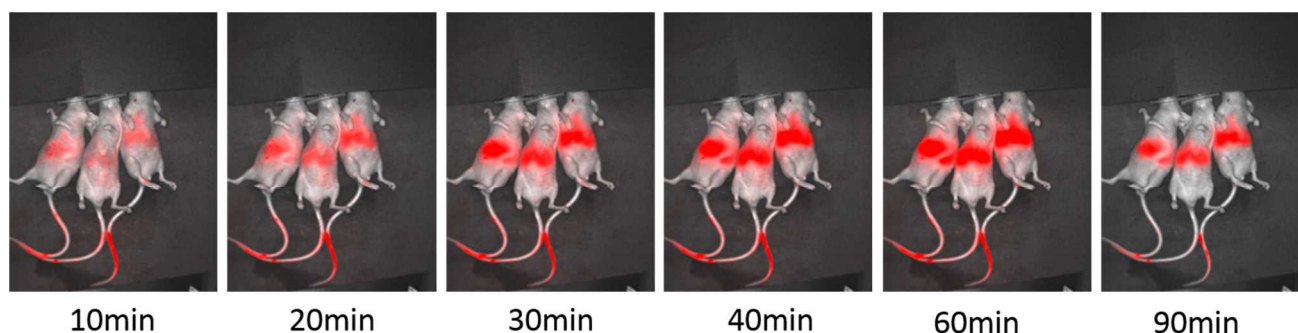


図 DiR 標識 ADMPC 投与後の蛍光観察像

経静脈的投与にて DiR 染色細胞が追跡可能であることが示された。

当該追跡が、経時的に可能であるか検討するため、ヌードラットに対して経尾静脈的に DiR 標識細胞を投与、18 時間後と 21 日後に蛍光観察を行った。

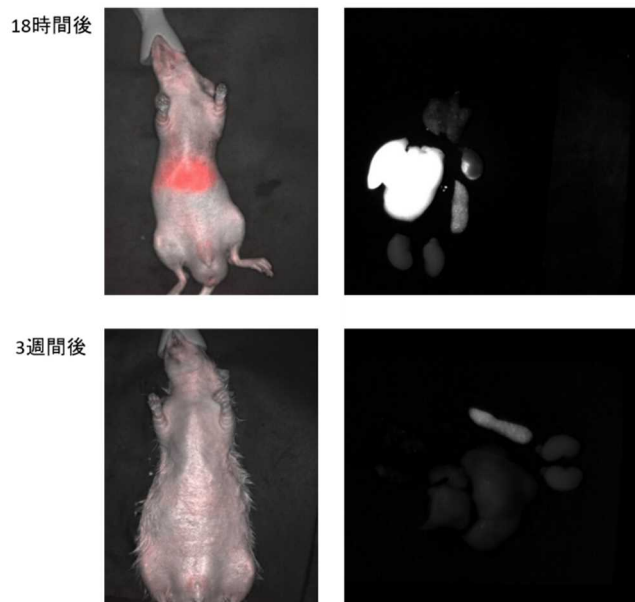


図 DiR 標識 ADMPC 投与後の経時的蛍光観察像

経時的に DiR 染色細胞が追跡可能であることが示された。

2-3-2. マウスに投与したヒト ADMPC の肝臓からの回収と遺伝子発現解析

ヒト ADMPC の移植後の *in situ* での細胞特性の変化の有無を調べるために、四塩化炭素投与により肝炎を惹起した C57BL/6J 系成体雌マウスにヒト ADMPC を尾静脈投与し、肝臓に分布した ADMPC を経時的に回収し、DNA アレイによる ADMPC の遺伝子発現解析を行うべく、回収細胞を提供した。具体的には、オリーブオイルに懸濁した四塩化炭素を週 2 回・体重 1kg あたり 300uL でマウスへ腹腔内投与し、5 週間後に尾静脈へヒト ADMPC を投与した。投与当日夕方 (Day 0), 翌日 (Day 1), 5 日後 (Day 5), 10 日後 (Day 10), および 14 日後 (Day 14) の 5 つの時期 (1 時期あたり 5 匹) に肝臓より ADMPC を回収した。

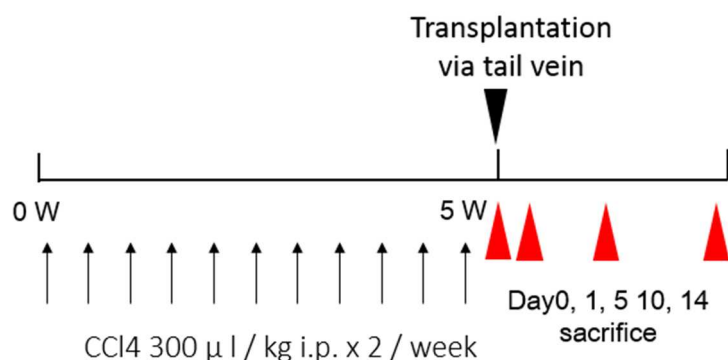


図 実験プロトコール

ADMPC の回収方法は、深麻酔後のマウスを開腹し、門脈よりコラゲナーゼ入り DME 液を灌流した後に肝臓を摘出、コラゲナーゼ入り DME 液内にて肝臓を細かく裂き、振盪することによって肝臓内に存在する細胞の懸濁液を得た。その後、細胞表面抗原であるヒト CD-90 蛋白質をマーカーとして抗ヒト CD-90 特異的抗体を結合した磁気ビーズを用いてヒト ADMPC を単離し（MACS マニュアル細胞分離装置：ミルテニーバイオテク）、得られた細胞懸濁液を遠沈してペレットにして凍結保存し、送付した。



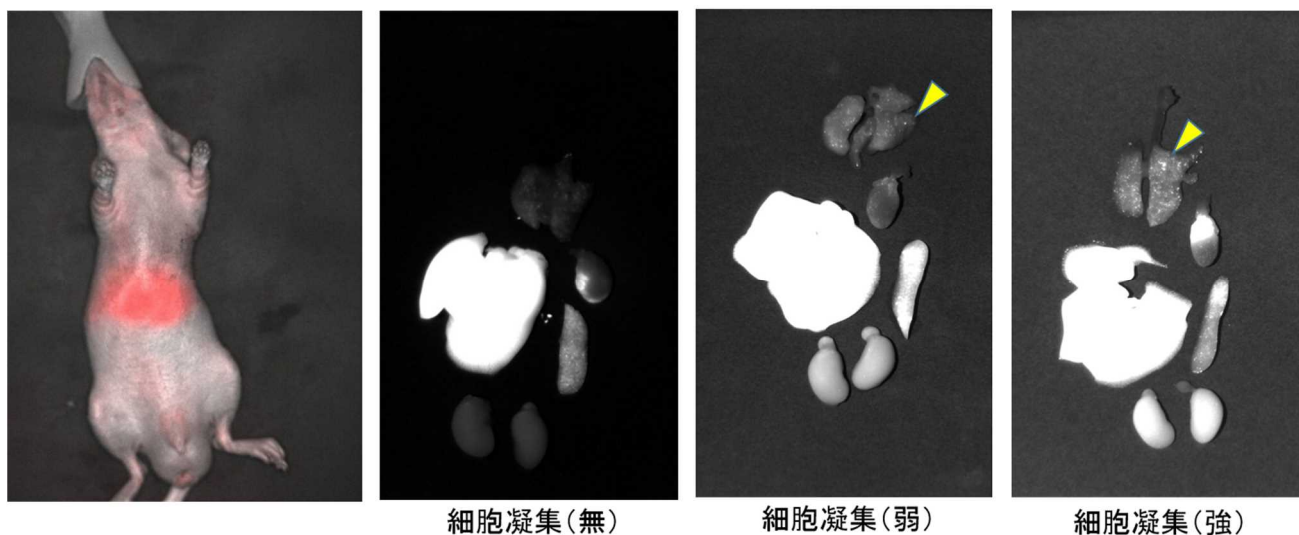
図 肝臓灌流時の様子：

- 左) 灌流前のマウスの肝臓の様子
- 中央) 灌流途上の肝臓の様子（部分的に肝臓の色が抜けている）
- 右) 灌流がかなり進んだ肝臓の様子（肝臓全体の色が薄くなっている）

2-3-3. IVIS の同等性評価への適用可能性の検証

製造工程が同一の複数ロット細胞に蛍光波長の異なる蛍光蛋白質遺伝子の導入を試みたが、脂肪組織由来多系統前駆細胞（ADMPC）にルシフェラーゼ遺伝子・蛍光蛋白質遺伝子などをウイルスにより感染させようとする、細胞の形態が変化し、その細胞特性の変化が同等であるとはいえないとの課題が表出した。

異なった個体に凝集傾向の強い ADMPC ロットと凝集を認めないロットの細胞を蛍光色素 DiR で染色し、経尾静脈投与を行った。



凝集性の高い ADMPC では肺に塞栓としてトラップされ、凝集性を認めない ADMPC ではすみやかに肝臓に分布することが明らかとなった。

in vitro における細胞凝集性という細胞特性は、*in vivo* において安全性上の懸念事項となることが明らかとなり、細胞凝集性は細胞特性の観点から IVIVC へと連結しうる同等性の評価指標であることが示された。

3. 評価手法等の開発・製造工程合理化のための検討内容

3-1. 評価手法の検証戦略

生物学的同等性は、安全性からみた評価手法と有効性からみたそれとに区分して開発を進める。安全性からみた生物学的同等性は、当該製品のヒトへの投与時に懸念される **risk issues** について議論すべきであり、当該製品は経静脈的に投与されるため、急性期の投与時の肺塞栓梗塞、遠隔期においては細胞の体内動態あるいは異所性分化を同等性評価として開発する。前者については、細胞濃度のコントロールに加え、細胞を懸濁した状態で放置した場合の細胞凝集性を同等性評価手法として開発する。後者については、経時的な体内動態についての評価が必要で、肝臓以外の臓器への分布パターンの評価手法の開発が研究の課題となる。

本剤のような **cell-based bio-actives delivery** では、有効性からみた生物学的同等性は、**MOA** に寄与する細胞由来生理活性物質の **bio-availability** が評価手法として適切であるかの検証を進める。本剤においては、その標的臓器は肝臓であり、**MMP**、**HGF**、**PGE2** が肝線維症の改善に寄与することから、肝内での投与細胞のそれら発現の検証が生物学的同等性・治療学的同等性評価に用いると想定し、検証を進める。これら **bio-actives** は **intrinsic** にも分泌されるため、肝臓 **whole** での評価できない。そこで、**IVIVC** (**in vivo-in vitro correlation**) の観点から、簡便かつ安価で信頼性のある **in vitro** での理化学的な評価手法として検証する。

製造方法・工程の変更にあつて、変更前の資料を申請資料として利用する場合、あるいは製造販売承認後に製造方法・工程の変更を余儀なくされた場合には、平成 24 年薬食発 0907 第 3 号通知にある通り、製品の「生物学的同等性」を示す必要が有る。

参考) 関連通知等

原材料の要求事項：生物由来原料基準

製品・製造工程の要求事項：GCTP、平成 24 年薬食発 0907 第 3 号通知

(第 2 章製造方法 第 3 最終製品の品質管理)

平成 24 年薬食発 0907 第 3 号通知には「生物学的同等性」を示す方策が提示されていない。そのため、同通知の第 2 章製造方法 第 3 最終製品の品質管理にある確認試験及び純度試験として、多くの場合細胞表面マーカーで評価されてきた。しかしながら、間葉系幹細胞の表面マーカーである **CD105** などで確認試験・純度試験を実施しても、間葉系幹細胞からのサイトカイン分泌量にはばらつきがあり、特にサイトカイン分泌をその作用本態 (**MOA**) とする再生医療等製品において、表面マーカーのみで生物学的同等性を評価することは困難であった。

生物学的同等性を適切に評価するための指標について、平成 24 年薬食発 0907 第 3 号通知の枠組みのなかから検討することとした。同通知 第 2 章製造方法 第 3 最終製品の品質管理には、11 の品質管理項目にかかる記載がある。確認試験及び純度試験としての表面マーカーに加え、それら項目のなかから効果効能試験を選択、**bio-actives** 産生を生物学的同等性評価指標とする新規方法 (別方法) を提案した。

生物学的同等性の本質は、generic に関連する通知等を渉猟すると、*in vivo* における bio-availability にあるとされている。*in vivo* における bio-availability は、generic では血中化成品であり、MOA が bio-actives delivery である細胞製剤においては、細胞そのものではなく、bio-actives である。本課題では、マーケット理論のパレートの原則を援用し、効能効果に寄与すると想定される複数の bio-actives に限定選択することで、生物学的同等性評価指標として、MOA を反映かつ過剰な指標項目数ともならず、有望である。

IVIVC による治療効果を観察し、治療学的に同等（非劣勢）であることを統計的に示し、別手法が妥当であることを示す。Generic での生物学的同等性の考え方を援用すると、生物学的同等性の本質は Bio-availability の compatibility / comparability であり、*in vivo* と *in vitro* の相関を別手法で示すことは、妥当である。

再生医療等製品を、その MOA および生着性という 2 つの切り口から分類する。

MOA	長期生着性	
	なし	あり
Bio-actives delivery	例) 脂肪組織由来多系統前駆細胞	例) 再生臍島
Cell/Tissue replacement	例) 培養皮膚	例) 臓器移植

本提案では、MOA が bio-actives delivery であり、かつ長期生着を想定していない再生医療等製品を射程としている。既承認としては、テムセル HS がその具体例となる。フローチャートを作成し、本マトリクスの考えかたを普遍的に参考にしてもらうこととしている。

3-2. 製造工程の検証

治験開始時には 1 ロット 5 回投与程度の製造とし、検証型治験では 1 ロット 50 回投与程度での製造を念頭に入れている。そのため本製品では、品質規格において、原料となる脂肪組織の個人差（原料ロット差）、生物由来原料基準適合対応あるいはコスト面からの牛胎児血清からヒト血液由来血清代替物への原材料変更の可能性、平面培養からマイクロキャリアを用いた浮遊大量培養導入による製造工程改善について議論され、既存の非臨床試験の申請資料としての利用可能性が大きな論点となる。機構からは生物学的同等性の担保を求められているが、その明確な組み立て方はこれまで提示されていない。前項にて検証された評価手法を用い、生物学的同等性について薬事戦略相談を実施する。

本提案にあたり、製造工程の一部変更をおこなっている。従前は、脂肪組織由来多系統前駆細胞の 6 回まで平面培養で継代し、回収後に細胞製剤として出荷することとしていた。変更後、第 3 継代までは平面培養にて継代することとしているが、第 4～6 継代を浮遊培養へと変更した。従前の製造工程では、回収した細胞の aliquot ごとにばらつきが想定され、同種由来再生医療等製品としてロット管理の困難性が指摘されていたが、タンク浮遊培養ののちに回収してすみやかに全量細胞を剥離回収することにより、回収した aliquot ごとのばらつきが低減され、ロットごとの製造管理が容易となり、品質管理基準上は抜き取り検査本数の低減も可能となる。

従前の細胞培養工程は継代数 6 まで平面培養法で行っていた。細胞数が増えるごとに培養容器が必要となるため、高コストであり、かつスケールメリットが得られない。また、培養平面ごとに細胞増殖が一定しない（特に多層の場合、層によって細胞の培養状態が異なる）ことがよく知られており、容器ごとに培養液中の酸素濃度や pH を測定することも現実的ではなく、適切なタイミングでの培養液交換が設定できない。

従前工程である平面大量培養の限界を解決するため、第 3 継代までは平面培養として変更せず、第 4 継代から第 6 継代までを浮遊大量培養とすることとした。培養液全体が攪拌されているため、その酸素濃度や pH を測定することが容易であり、培地交換のタイミングを適切に管理することが可能である。

従前工程で得られた細胞製剤と別手法工程で得られた細胞製剤について、生物学的同等性を評価することにより、品質・安全性・有効性は同等でありながら、経済的に優位な手法として提示する。生物学的同等性評価手法については、研究開発計画に示すとおり、研究開発を進め、対面助言での成果など、広く公開することとしている。

特に間葉系幹細胞については、平面培養にて研究開発・製造が行われているところである。浮遊大量培養の **feasibility** を示すことで、浮遊大量培養の先にあるタンク培養への展開性を産業界に示すことが可能となる。

4. まとめ

同種由来再生医療等製品製造技術のトレンドは、大量培養と自動化（半自動化）にある。

同種由来再生医療等製品のメリットを生かす大量培養においては、培地コストや生物由来原料基準適合性を念頭に入れなければならない。テルモ BCT の中空糸ダイアライザーを用いる系では、所要培地に加えプライミング培地の容量がかさみ、平面培養でのそれと比較して 5 倍以上の培地を要し、また細胞の接着性が低いため、我々が検証したところでは間葉系幹細胞の培養には不向きであった。生物由来原料基準適合のために多くの無血清培地が開発されているが、間葉系幹細胞用とされるそれらにはほぼ TGFβ が添加されており、継代を繰り返すとコラーゲンなどの分泌増加による細胞回収効率の低下と、線維芽細胞への劣化が惹起される。

再生医療は、人材消費型産業であるため固定費としての人件費の低減は産業化に向けて避けられない課題である。そのため、再生医療においては、自動培養技術（人手低減）や大量培養技術（ヒューマンリソース投資回収効率向上）の開発が競われている。自動培養技術については、わが国の川崎重工業が先行し、テルモ BCT、ついでニプロが追っている。これら自動培養技術・装置の開発は、開発初期から軟骨再生など自己細胞を用いることを念頭に入れていたため、同種細胞のメリットである大量培養には利用しにくいという現状がある。大量培養装置としては、多層平面培養フラスコ（BD 社が開発したマルチスタック・セルバインド技術）、マイクロキャリアを担体とする wave system（GE）やバイオリアクター（エイブル、BD など）が有る。大量培養においては、トリプシン等の処理と細胞傷害の少ない回収方法が求められているが、多層平面培養でもマイクロキャリアを担体とする場合でも、未だ解決されていない産業上の課題である。世界マーケット売り上げからみると BD 社のマルチスタック多層平面培養システムが主流となりつつあるが、わが国では Well ごとにロット管理が求められること、機器設置所要面積が大きいこと（スペース賃料の高騰）、現状では自動化に対応仕切れていない（人件費低減効率が低い）ことから、導入している企業は多くはない。特に、本開発での出口を引き受ける AMT を含め、資本金力の小さい再生ベンチャーの導入には敷居が高い。

このように同種由来再生医療等製品の開発に向け、多くの技術開発が行われているが、規制対応や製造工程変更に伴う同等性の評価についての議論はこれからであり、生物学的同等性 package 構築の一助となる本研究には、重要性・必要性がある。

生物学的同等性を議論するにあたり、角膜内皮細胞のように生着機能を期待する replacement therapy と、我々が開発している再生医療等製品の MOA である cell-based bio-actives delivery とは異なった考え方が必要である。角膜内皮細胞のような replacement therapy では、目的細胞以外の不純細胞が目的細胞の生着・機能を妨げるため、生物学的同等性評価では、single cell にわけて、単一細胞あるいは細胞亜集団の評価が必須となる。一方、本申請製品をはじめとする cell-based bio-actives delivery では、毒性学的にみて目的外生理活性物質が安全性上の risk issues でないのであれば、製品を構成する細胞集団としての生理活性物質の産生性の幅を生物学的同等性の評価に用いることが可能で、単一細胞の評価といった手法は不要となり、再生医療に現実性をあたえるものとなる。加えて、生物学的同等性の評価は、規制対応が求められる産業界から求められるだけでなく、科学技術の観点からも議論されるべきである。これまで間葉系幹細胞に関して多くの知見がもたらされているが、モデル動物を用いた実験で有効であったとする論文、無効であったとする論文など結論は百家争鳴である。これは、間葉系幹細胞のスタン

ダードがないことにより生じた課題であり、本研究の成果としての生物学的同等性評価手法が解決する一助となると思われる。

再生医療産業の活性化のためには、再生医療等製品開発費用や海外製品導入費用の低減、製造販売承認後のマージン確保が不可欠である。前者では、生物由来原料基準へ適合させるための検証費用や海外試験成績と連結が可能であれば、大きな解決をみる。後者では、製造販売承認取得後のスケールアップなど製造工程変更）をシームレスにする規制的枠組みの提示により、解決の緒となる。本申請にて行い公開する生物学的同等性評価手法は、一つの答えとなる。

長期的にみて、生物学的同等性評価手法の提示は、bio generic/bio similar への展開を必要とする。製造工程が低コスト化されれば Auto-bio generic 戦略もありえ、より普遍的な疾患が適応症となり、多くの患者さんが再生医療により救われることとなろう。