

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	羊膜を基質として用いる培養自家口腔粘膜上皮シートの研究開発
研究開発代表者 所属 役職 氏名	公益財団法人先端医療振興財団 再生医療製品開発室 室長 郷 正博

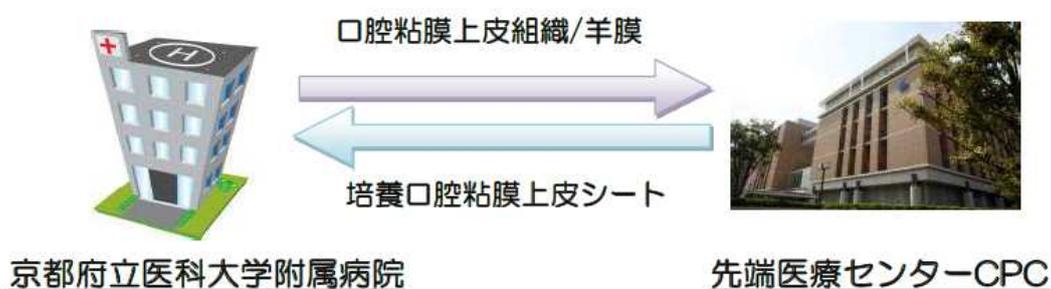
## 目次

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

## 1. 事業の目的

先端医療振興財団（以下、先端財団）は、京都府立医科大学（以下、京都府立医大）と共同で、羊膜を基質として用いる口腔粘膜上皮シートの臨床開発を進めてきた。本品は、ヒト羊膜由来の基質上で患者の口腔粘膜上皮細胞を重層化させて製造される培養自家口腔粘膜上皮シートであり、京都府立医大において難治性角結膜疾患に対して開発された優れた再生治療法である。京都府立医大における先行臨床研究結果によって本治療法の安全性と有効性を示す結果が得られており、その結果に基づいて、先端財団施設において試験物の製造・品質管理を行い、京都府立医大附属病院にて移植手術を行うスキームによって先進医療Bを実施した。以下に、本品の先進医療Bにおける実施スキームと本治療法の概念図を示した。

### 先進医療B 実施スキーム



### 治療スキーム



しかし、先進医療Bから製品化を目的とした臨床試験である治験に移行するためには、いくつかの重要な課題を克服する必要があった。具体的には、同種組織（原料羊膜）の使用、複数の生物由来原料の使用、原料変更の必要性、シート全体に関する評価の必要性、移植後の上皮細胞生着の必要性、工程内汚染管理を含めた品質管理強化の必要性等、の事実から生じる課題である。そこで、本事業においては、これらの課題を克服するために、下記の研究開発項目を設定した。

- 1) 原料羊膜入手方法
- 2) 製造販売元からの原料関連情報の入手方法

- 3) 原材料変更等の製造工程変更に伴う上皮シートの同等性評価方法
- 4) 上皮シートの保管及び輸送安定性評価方法
- 5) 先進医療から治験に移行するために必要な各種工程のグレードアップ方法

これらは再生医療製品開発における極めて一般的な課題と考えられる。そのため、上記課題を克服する過程においては、後続の再生医療製品、特に日本のアカデミアによる臨床研究実績を有する製品、の開発に有用な知見を得ることが期待できると考えられた。そのため、本品の治験を準備する過程を通じて上記課題に取り組み、審査当局である医薬品医療機器総合機構（PMDA）との協議内容を踏まえて、本品に関する評価手法の試行・検証を行うことを本事業の目的とした。

## 2. 実施内容及び結果

本品治験準備のため、京都府立医大の協力を得て本品の製造・品質に関する基礎検討（ボランティアから採取した口腔粘膜上皮組織試料を用いた口腔粘膜上皮シートの製造及び品質管理の検証「口腔粘膜上皮シートの製造バリデーションと品質特性データの取得」、以下、コールドラン＝ CR）を行った。その実施スキームは、移植を実施しないことを除けば、先進医療 B におけるスキームと同様である。ただし、原料羊膜は神戸市立医療センター中央市民病院から基礎検討（「培養自家口腔粘膜上皮シート製造に使用する羊膜基質の製造及び品質管理工程に関する検討」）用に入手した物を用いた。本品コールドランは、平成 28 年度中に 10 例を実施した。主にその過程において、本事業における各研究開発項目を実施した。コールドランの各例において実施した主な検討項目（主要及び副次検討項目）を以下の表にまとめた。

製造番号	シート数	主要検討項目 1	主要検討項目 2	副次検討項目
TR9-CR-160712-01	2	シート安定性	羊膜基質安定性	製造手技
TR9-CR-160802-02	2	培地評価	シート安定性	製造手技 安全性試験スキーム
TR9-CR-160816-03	2	培地評価	シート安定性、 シート実体顕微鏡観察	製造手技、 羊膜基質安定性
TR9-CR-160913-04	2	培地評価	シート安定性、 シート実体顕微鏡観察	製造手技、 安全性試験スキーム
TR9-CR-161004-05	2	シート蛍光顕微鏡観察	シート実体顕微鏡観察	残留評価
TR9-CR-161025-06	2	シート蛍光顕微鏡観察	シート実体顕微鏡観察	残留評価
TR9-CR-161115-07	2	シート蛍光顕微鏡観察	培地評価	残留評価
TR9-CR-161206-08	2	シート蛍光顕微鏡観察	培地評価	残留評価
TR9-CR-170207-09	2	シート蛍光顕微鏡観察	培地評価 安全性試験スキーム	残留評価
TR9-CR-170228-10	2	シート蛍光顕微鏡観察	培地評価 安全性試験スキーム	残留評価

以下に、平成 28 年度における各研究開発項目の実施内容と結果を簡単にまとめた。

## 1) 原料羊膜入手方法

本品の原料羊膜は、先進医療 B 実施時においては、眼科移植用羊膜を調製・提供する日本組織移植学会認定の羊膜バンク（京都府立医大）から入手した。ただし、羊膜バンクが提供する羊膜は眼科移植用（眼科における羊膜移植は 2014 年 4 月から保険収載されている）であり、原料羊膜用ではない。また PMDA 戦略相談対面助言において、治験用原料羊膜に関しては、眼科移植用羊膜に実施されている感染症検査に加えて、さらに追加の検査を要求されていた。そのため、羊膜バンクからではなく、別ルートにより治験用の原料羊膜を入手し、感染症検査を実施する必要があった。

羊膜バンク（京都府立医大）は NPO 法人再生医療支援機構を經由して病院産婦人科から羊膜を入手している。そこで、計画中の医師主導治験時に使用する治験用羊膜に関しても、再生医療支援機構から直接入手することを交渉し、平成 29 年 1 月に開催された理事会において基本的な了解を得た。これは、将来的には、羊膜バンクにおける眼科移植用羊膜と本品原料用羊膜が同一ルートで入手できることが望ましいと考えたからである。すなわち、本品移植治療の多くは羊膜移植との併用治療であり、同一手術時に移植される 2 つの羊膜（眼科移植用羊膜と本品原料羊膜）に要求される感染症検査の内容が異なることは望ましくないからである。

ただし現状では、羊膜移植用の羊膜とは別の同意説明文書により治験用原料羊膜を入手する予定であり、治験用途に限ることになっている。なお、平成 28 年度の本事業における成果は治験用羊膜入手経路の確保に留まり、製造販売承認後の商業用羊膜入手経路の確保と方法は今後の課題である。

## 2) 製造販売元からの原料関連情報の入手方法

先行して実施していた本品に関する PMDA 戦略相談対面助言において、上皮シート培養用培地（DK-SFM 培地）の情報未開示構成成分、及び培地に含まれる生物由来原料の生物由来原料基準適合性に関して、製造販売元から適切な情報を入手する必要性を指摘されていた。また、必要に応じて、相談者（先端財団）と培地の製造販売元、PMDA の三者による面談の実施を推奨されていた。

その指摘を踏まえて、先端財団は、培地関連情報を入手することを目的とした秘密保持契約を製造販売元と締結した。その結果、培地の未開示成分等に関しては、情報のマスターファイル登録により、製造販売元から PMDA に対する情報開示を進めることで合意した。また、培地に含まれる構成成分の製造工程、ウイルス不活化工程等に関する情報についても製造販売元により情報入手が進められた結果、DK-SFM 基礎培地については生物由来原料基準への適合の見込みがあることが判明し、一方、DK-SFM サプリメントについては生物由来原料基準への適合に関して解決困難な要因が存在する可能性があることが判明した。

上記結果を踏まえて、DK-SFM 培地に関して入手した情報と今後の方針の妥当性を確認するため、先端財団と製造販売元担当者（再生医療担当及び薬事担当）により、平成 28 年 12 月 13 日に PMDA 面談を実施した。その結果、DK-SFM 基礎培地の未開示構成成分及び生物由来原料基準適合について、製造販売元が予定していた情報提供の内容で問題ないことを確認することができた。すなわち、DK-SFM 基礎培地関連情報に関しては、製造販売元から PMDA へ情報提供することにより治験実施可能であることが確認できた。また、上皮シート用培地（DK-SFM 培地）に関しては、基礎培地の機能的な重要性を確認済みであり、基礎培地のみで上皮シートが作製可能であることも予備的検討により確認していた。その

ため、上皮シート用培地はサプリメント無添加の DK-SFM 基礎培地を使用する方針に決定した。

### 3) 原材料変更等の製造工程変更に伴う上皮シートの同等性評価方法

先進医療 B 実施時において、上皮シートの評価は、製造部門による位相差顕微鏡観察、細胞数測定、シート凍結切片の抗体染色により主に行われた。特に製造部門による位相差顕微鏡観察が最も重要な役割を果たしていた。しかし、その状況には以下のような問題があり、治験開始前あるいは治験終了後に改善する必要性が生じていた。

第一に、シートの位相差顕微鏡による観察は極めて熟練が必要である。これは、通常の細胞培養とは異なり、カルチャーインサートに貼付した羊膜基質上に細胞シートを作製するためであり、位相差顕微鏡でシート形成を正しく評価するためにはかなりの経験が必要である。以下の図 1 に位相差顕微鏡写真の例を示した。



図 1. 培養終了時における上皮シートの位相差顕微鏡写真 (左 : CR-03、右 : CR-05)

この例では、左側の CR-03 のシートが、細胞数が少なく低品質のシートであり、右側の CR-05 のシートが、細胞数が多く高品質のシートである。写真から明らかなように、シートの品質評価は容易ではない。すなわち、品質部門が評価できる写真等の記録が存在しないことになる。

第二に、シート凍結切片の抗体染色による評価は、シートの部分的評価になり易い傾向がある。以下の図 2 にシート切片の抗体染色写真の例を示した。上記位相差顕微鏡写真と異なり、シートの評価は比較的容易であるが、必然的にシートの一部 (切片部分) のみを観察することになる。

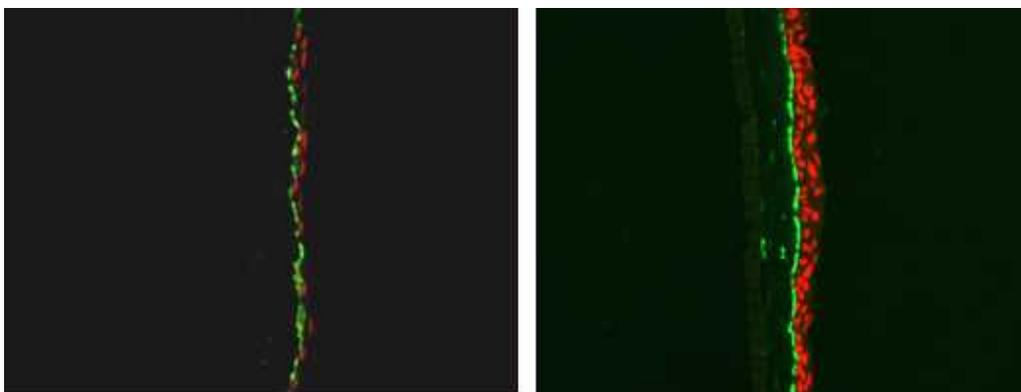


図 2. 上皮シート切片 (断面) の抗体染色写真 (左 : CR-03、右 : CR-05)

赤色 : 細胞核染色、 緑色 : フィブロネクチン (羊膜基質)

また、シートにおける細胞数は極めて重要であるが、逆にシート全体を平均化したパラメーターとなっている。一方、経上皮電気抵抗値測定等によりシート全体のバリア機能を評価する方法は一般的であるが、本品の場合、羊膜基質上にシートを形成するため、測定の意義が極めて低い。

上記を踏まえて、品質部門によるシート全体の評価が可能な簡便な方法を開発することを目標とした。最初に、上皮シートを適切な照明下で実体顕微鏡により写真撮影する評価を試みた。以下の図3にシートの実体顕微鏡観察写真の例を示した。実体顕微鏡写真中の白黒の濃淡により、細胞の有無及び細胞密度の評価が可能であることが分かった。

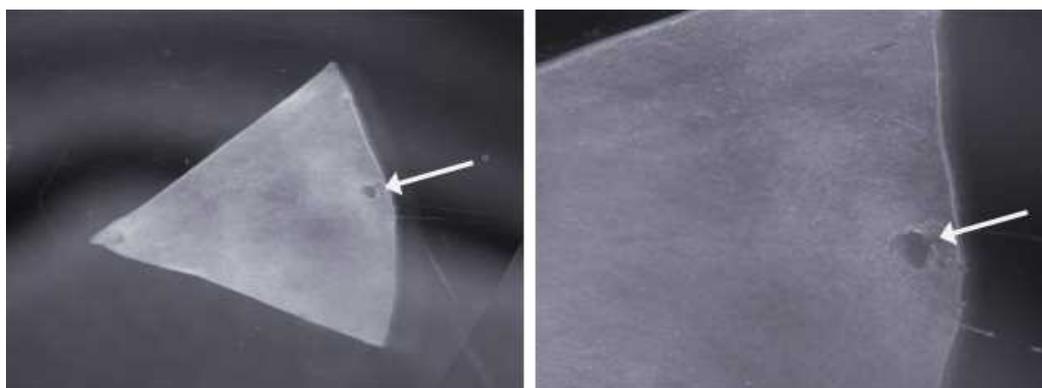


図3. 上皮シート (1/8) の実体顕微鏡写真 (左：低倍率、右：高倍率)

矢印：上皮シート観察時 (インサート除去等) にピンセットで傷付けた箇所

この方法は上皮シート全体の観察と評価に有用であることが判明したが、定量的評価には不十分であった。そこで、上皮シートをホルマウントで蛍光色素による核染色を行い、上皮シート全体を観察する方法を試みた。以下の図4にシートの蛍光顕微鏡観察写真の例を示した。

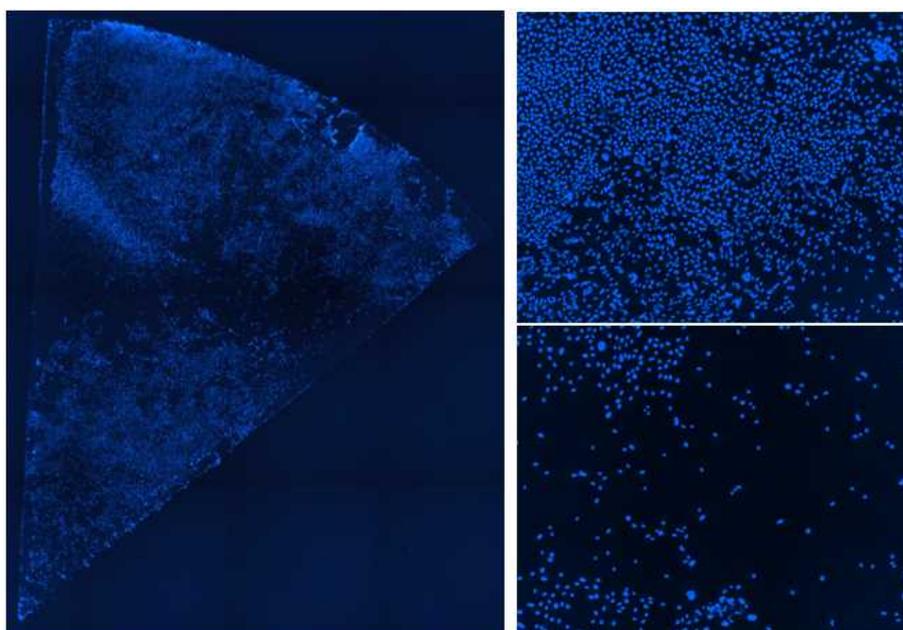


図4. 上皮シート (1/8) の細胞核染色写真 (対物 4 倍)、  
右側：細胞密度高い (上) & 低い (下) 領域 (対物 20 倍)  
細胞数：3075 (右上図) & 345 (右下図)

その結果、核染色後の蛍光顕微鏡写真観察は、上皮シートにおける細胞分布、細胞密度の評価に極めて有用であることが分かった。すなわち、シート全体の形態的観察に関して客観的な記録を残すことができることを確認した。また、シートに許容できない不均一性がないことを確認するために、局所的な細胞密度を定量することでシート評価の基準を設定できることも判明した。現在までに、品質試験用シートの低倍率写真撮影後、最も細胞密度の低い領域の高倍率写真を撮影し、細胞核数を計測して細胞密度を算出する、あるいは細胞が占める面積の割合を算出する、ことでシートを定量評価する方法をほぼ確立し、暫定規格値を設定した。

この方法は比較的簡便であり、品質部門によるシート全体の定量的評価が可能になった。例えば、培地評価の過程において、細胞数は十分であり、切片による抗体染色結果も適合であったにも拘わらず、シートに顕著な不均一性がある事実を検出することができた。以下の図5にその例を示した。

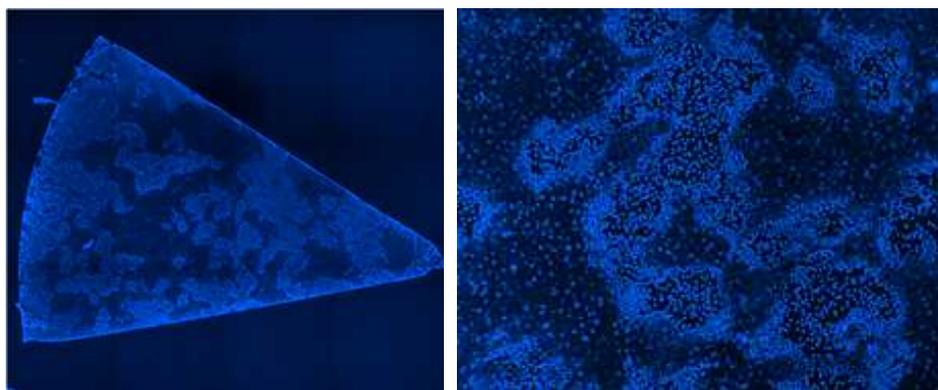


図5. 上皮シート(1/8)の細胞核染色写真、(左：低倍率、右：高倍率)

本方法を含めたシートの品質評価により、サプリメント無添加の上皮シート用培地を使用することでサプリメントを添加した場合と同等な上皮シートが作製可能かどうかを検証し、問題なく作製可能であることを確認した。その結果として、培地を最終確定することができた。

#### 4) 上皮シートの保管及び輸送安定性評価方法

再生医療製品の多くは、移植後の細胞から分泌される増殖因子等の移植部位周辺組織への効果を作用機序としている。その場合、移植細胞の生存は必要であるが、増殖自体は不可欠でないことも多い。一方、本品の場合は、移植後に上皮細胞が生着・増殖しなければ上皮細胞が脱落してしまうことになるため、移植後の上皮細胞の生着と増殖が不可欠と考えられている。

すなわち、上皮シートの安定性評価に関しては、移植細胞の増殖活性と移植後の生着率に相関があると考えられることから、細胞生存率に加えて細胞増殖活性の評価が重要と考えられた。そこで、上皮シートの安定性評価として、輸送用容器に充填した上皮シートを保管後、上皮シートの細胞生存率、細胞増殖活性、組織解析を実施した。細胞増殖活性は、上皮シートから単離した細胞のコロニー形成能を測定することで行った(コロニー形成試験)。コロニー形成試験は、単離した細胞を低い細胞密度で一定数フィーダー細胞上に播種し、細胞のコロニー形成能をコロニー数により評価するものである。

過去に実施した予備的な評価試験においては、同一の口腔粘膜上皮細胞を用いてシートを作製し、保管前と2日間冷蔵及び室温(23~24℃)保管後のシートに関してコロニー形成試験を行った。その結果、コロニー形成率は保管前と比較して若干低下したが、室温の方がやや低下の程度が小さかった。

すなわち、室温保管の方が細胞の増殖活性を維持するうえでは優れている可能性が示唆された。しかし、室温（この場合、23~24℃）の温度管理は難しく、特に輸送時には利用できる温度管理方法が存在しなかったため、その時点では、冷蔵保管で進めることとした。

一方、現在では、輸送時の温度管理システムとして、専門の輸送業者により常温の温度管理システムが開発されている。すなわち、本品のような再生医療製品の輸送システムとして、冷蔵だけではなく常温の温度管理も可能になっている。そこで、本品の適切な保管温度を評価するために、冷蔵（およそ2~8℃）と常温（およそ15~20℃）を比較検討することとした。常温については、およそ10~25℃を想定したが、目標温度管理帯として15~20℃の温度管理システム（断熱ボックスと蓄熱材・蓄冷材の組み合わせによる温度管理）を採用した。これは、細胞の代謝活性を穏やかに抑えることを目的とした温度管理である。

そこで、コールドラン時に作製したシートを用いて4回の安定性試験を実施し、それぞれの保管条件は2日間冷蔵と常温、3日間冷蔵と常温とした。コロニー形成試験の例（写真）と結果を図6と表1に示した。

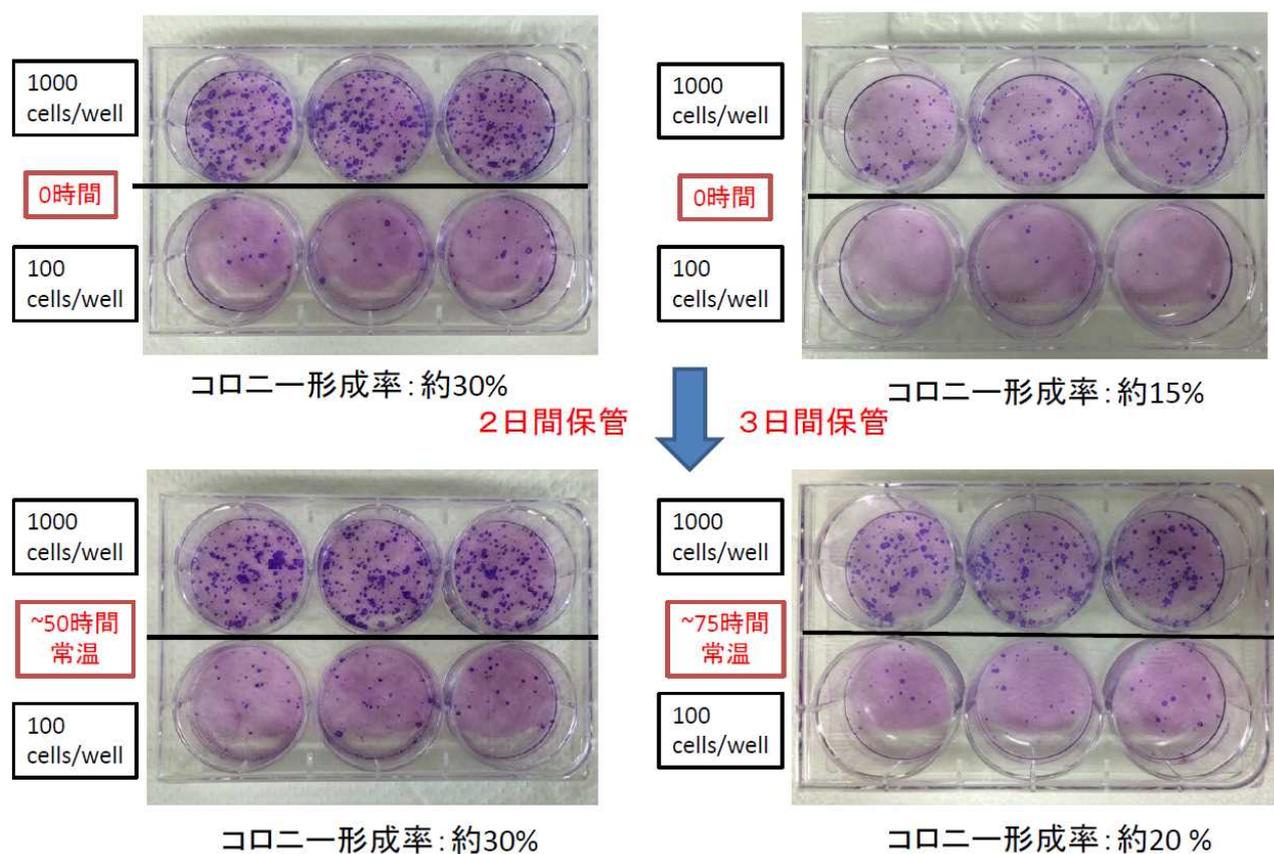


図6. 上皮シートから単離した細胞を用いたコロニー形成試験の例

表1. コールドランのシートを用いた保管安定性試験

シート製造番号	保管条件	細胞生存率 (%) (保管前との差異)	コロニー形成率 保管前 (0 時間) との比率
CR#03	2 日間冷蔵	95.8 (+7.6)	1.6
CR#01	2 日間常温	96.6 (+0.9)	1.27
CR#02	3 日間冷蔵	94.8 (+0.9)	0.25
CR#04	3 日間常温	96.3 (+1.6)	1.67

その結果、3 日間冷蔵保存した場合のみ、保管時間 0 日間のコントロールと比較して、コロニー形成率が顕著に低下した。その後、凍結保管細胞を用いてシート 2 枚を作製し、3 日間冷蔵と常温の保管条件を直接比較したところ、常温保管と比較して冷蔵保管条件のコロニー形成率が顕著に低かった。その結果を表 2 に示した。

表2. 凍結保管細胞で作製したシートを用いた保管安定性試験

保管条件	細胞生存率	細胞数 (常温/冷蔵の比率)	コロニー形成率 (常温/冷蔵の比率)
3 日間保管 冷蔵&常温	冷蔵 (94.2%) 常温 (93.8%)	2.4	9.0

以上、3 日間以上保管する場合は常温保管が優れており、保管後も十分な細胞増殖活性が存在することが示された。また、上皮シート安定性評価として、コロニー形成試験による細胞増殖活性評価が有用であると結論した。

#### 5) 先進医療から治験に移行するために必要な各種工程のグレードアップ方法

先進医療から治験に移行するために、各種品質管理工程のグレードアップ方法を検討した。

第一に、口腔上皮由来株細胞を使用することによる培地性能試験方法を検討・確立した。最も重要な性能試験対象はウシ胎児血清 (FBS) である。FBS はロット変更時に性能試験 (ロット試験) を行うが、再現性の高い試験を行うために、NIH3T3 細胞や HeLa 細胞を用いていた。しかし、前者はマウス由来の間葉系細胞であるため、細胞増殖特性が口腔粘膜上皮細胞とは大きく異なり、後者は由来組織が異なるうえに細胞増殖能が極めて高く、性能試験に用いる細胞としては最適ではなかった。そこで、口腔上皮由来株細胞を用いることにより、本来の口腔粘膜上皮細胞と近い特性を持つ細胞を用いて、再現性良く性能試験を実施することが可能になった。口腔上皮由来株細胞としては、H0-1-N-1 細胞を用いた。ただし、H0-1-N-1 細胞は羊膜基質上における増殖と重層化の程度が良好ではなく、各種検討において口腔粘膜上皮細胞の代替として有用であるかどうかは明らかでなかった。一方、別の口腔上皮由来株細胞である TR146 は、羊膜基質上で重層化したシートを形成することが分かった。以下の図 7 に TR146 によるシート切片の抗体染色結果の例を示した。

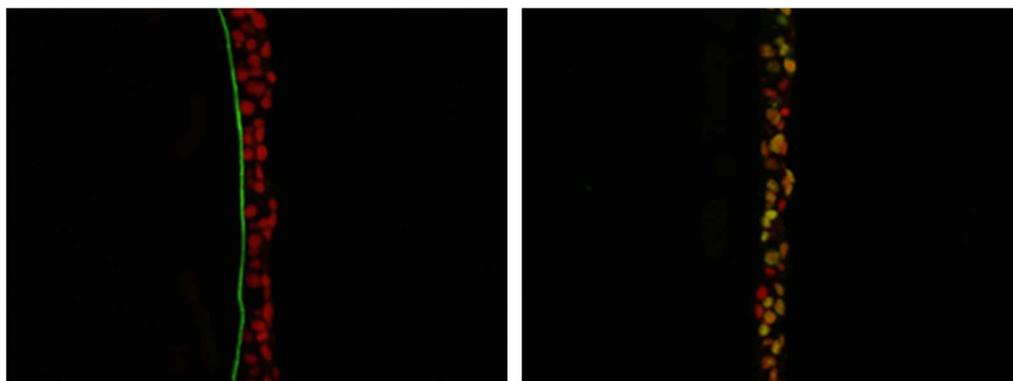


図 7. TR146 を用いて作製したシート切片の抗体染色写真

赤色： 細胞核染色、 緑色： 7 型コラーゲン（左）、Ki67（右）  
 コラーゲンは羊膜基質、Ki67 は増殖細胞が染色される

すなわち、口腔粘膜上皮由来株細胞を用いることで、培地性能試験だけではなく、各種検討試験が再現性良く実施できることが明らかになった。例えば、各種酵素（トリプシン等）の受入試験としても使用可能であることを確認済みであり、有用であることが分かっている。

第二に、迅速検出法（炭酸ガス検出法）に基づく無菌検査法を導入し、製造工程中の汚染（無菌）管理をより効率的かつ徹底的に実施することを試みた。その目的のため、本品製造工程中の各種検体について、試験開始後 3 日以内に判定できることを基準としてバリデーションを実施・終了した。以下の表 3 に主な結果をまとめた。表中の数字は、試験開始から陽性が検出されるまでの時間（日）を示している。

表 3. 迅速無菌検査法適合性試験結果

検体名 / 菌種	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Clostridium sporogenes</i>
生理食塩液 (コントロール)	1.87	0.68	1.99	0.88	0.77	1.22
3T3 培地	2.35	0.69	1.17	0.83	0.68	1.02
製品保存液	2.08	0.69	1.13	0.84	0.67	1.04
羊膜保存液	2.68	0.95	1.79	1.43	0.84	1.40
搬送液	1.93	0.83	1.74	0.84	1.21	1.25
上皮シート用培地	2.07	0.65	2.93	0.82	0.86	0.99

表中で羊膜保存液から下の試験試料は、抗生物質のゲンタマイシンを含んでいる。また、羊膜保存液にはグリセリン、搬送液（口腔粘膜組織用）には抗生物質-抗真菌剤が含まれている。そのため、羊膜保存液に関しては 5 倍希釈、搬送液は 30 倍希釈の検体を用いた。その結果、全ての試験検体について、3 日以内に陽性結果が出ることを確認できた。

なお、本無菌検査の試験感度を確認する目的で、先進医療 B における搬送液の無菌検査を日本薬局方無菌試験と並行して実施した。その結果、搬送液検体を 30 倍希釈する必要があったにも拘わらず、本無菌検査法による菌検出（3 日以内）に全く問題は認められなかった。すなわち、日本薬局方無菌試

験で陽性だった検体が無菌検査で陰性だった例は一例もなかった。すなわち、迅速法として、日本薬局方無菌試験と同等の感度を有していると結論した。

以上の結果、調製後の各種培地、培養中の培養上清、上皮シートの最終洗浄液等、重要ではあるが時間と経費の関係で今まで無菌試験を実施できていなかった検体について、比較的簡便かつ迅速に無菌検査を実施できるようになった。さらに、マイコプラズマ否定試験の日本薬局方第 17 改正等に対する対応を含めて、外部委託試験を併用することで、製造工程全体における汚染管理方法を確立することができた。

第三に、最終製品における不純物残留評価を目的として、上皮シート抽出液及び上皮シート洗浄液（洗浄回数 5 回）における各種添加因子の ELISA による測定を行った。これは、上皮シートにおける不純物残留評価とともに、上皮シートの洗浄バリデーションを実施したものである。以下の表 4 に FBS 中に含まれる BSA の残留濃度測定結果を示した。

表 4. BSA 残留濃度の ELISA による測定結果

検体名		濃度 (ng/mL)	洗浄液中の残留量 ( $\mu$ g)
TR9-161024-25 (先進)	洗浄 1 回目	345.59	15.55
	洗浄 2 回目	75.89	3.42
	洗浄 3 回目	33.43	1.50
	洗浄 4 回目	18.19	0.82
	洗浄 5 回目	下限量限界未満 (6.25 未満)	下限量限界未満 (0.28 未満)
TR9-CR-161004-05	洗浄 1 回目	360.41	5.40
	シート抽出液	21.33	170.67 ng/シート

測定の結果、洗浄回数を重ねるごとに BSA の残留量が減少していることが確認できた。また、最終洗浄液には残留を検出することはなかった。ただし、シート抽出液中には一定量の残留が検出された。

次に、表 5 に添加因子として加える Insulin の残留濃度測定結果を示した。

表 5. Insulin 残留濃度の ELISA による測定結果

検体名		濃度 (pM/L)	洗浄液中の残留量 (ng)
TR9-161024-25 (先進)	洗浄 1 回目	451.22	117.77
	洗浄 2 回目	86.06	22.46
	洗浄 3 回目	15.60	4.07
	洗浄 4 回目	下限量限界未満 (15.6 未満)	下限量限界未満 (4.07 未満)
	洗浄 5 回目	下限量限界未満 (15.6 未満)	下限量限界未満 (4.07 未満)
TR9-CR-161004-05	洗浄 1 回目	上限量限界超 (500 超)	上限量限界超
	シート抽出液	下限量限界未満 (15.6 pM/L 未満)	下限量限界未満 (723.84 pg/シート未満)

測定の結果、BSA と同様に、洗浄回数を重ねるごとに Insulin の残留量が減少していることが確認できた。また、シート抽出液に残留を検出することはなかった。シート抽出液に BSA の残留が検出された事実に関しては、分子量等の物理的特性が影響している可能性もあるが、やはり培地中の含有濃度が高いことが最も大きな要因として考えられた。BSA 残留濃度に関しては、品質試験として各ロットにおいて測定しているが、その妥当性を確認することができたと考えている。

以上、シート内不純物残留評価において、最終製品（シート）洗浄液を検体として測定することが、洗浄バリデーションの目的を含めて、極めて有用かつ重要であることを確認した。

これらの結果に基づいて、抗生物質（ペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン）の残留評価についても、外部委託試験により測定方法（LC/MS 法：液体クロマトグラフィー分離後の質量分析法）の分析バリデーションを実施し、最終製品洗浄液の測定を実施した。その結果、1 回目の洗浄液において既に検出限界未満であることが分かった。

### 3. 評価手法等の開発・製造工程合理化のための検討内容

本事業においては、先進医療 B 実施中の再生医療製品である培養自家口腔粘膜上皮シートに関して、検証的治験を実施するために必要な課題を解決することを目的とした。その過程を通じて、後続の再生医療製品の開発に有用な知見を得ることが期待できると考えられた。以下に、主な検討内容と結果から得られた知見をまとめた。

再生医療製品の原材料のうち、生物由来原料に関しては、規制当局（PMDA）により生物由来原料基準への適合が厳しく求められる。しかし、原料の製造販売元から必要十分な情報を入手することは容易でない。今回、製造販売元の協力を得て PMDA 面談を実施し、規制当局に原料情報を提供する方法に関して了解が得られた。製造販売元との二者協議あるいは規制当局との二者協議ではなく、規制当局と製造販売元を含めた三者協議を行うことで、より効率的かつ迅速に開発を進めることができた。今後、製造

販売元からの情報入手、及び規制当局への情報提供に関する方法に関して、三者協議（面談）の利用と製造販売元から規制当局への直接の情報提供は、重要な方法論として定着するものと考えられる。

シートの品質評価は、現在まで主に位相差顕微鏡観察、細胞数測定、切片の抗体染色等により行ってきたが、シート全体の性状評価は不十分であった。すなわち、製造担当者の熟練を要する観察・評価であること、シートの平均的評価あるいは部分的評価であること等の問題があった。また、羊膜基質上にシートを形成するため、一般的にシートの評価方法として利用される経上皮電気抵抗値測定の意義は極めて低い。本事業においてシートのホールマウントによる核染色を導入したことで、品質部門がシート全体の性状を簡便かつ定量的に評価することが可能になり、製品化への課題が一つ克服できた。

一般的に、再生医療製品の品質評価として最も重要な項目のひとつは安定性と考えられる。保管あるいは輸送時の条件が凍結か冷蔵かにも依存するが、凍結状態から融解した後の有効期間は、細胞加工製品であるため、短期間にならざるを得ない。本品のようなシート状製品の場合、凍結状態で保管・輸送することは事実上不可能であり、一定温度条件における安定性が製品化にとって極めて重要な要件となる。一方、細胞加工製品の安定性評価は主に細胞生存率測定により行われているのが現状である。これは、多くの細胞加工製品の作用機序が、移植後の細胞から分泌される増殖因子の効果を主としている事実と関係していると考えられる。しかし、本品の場合、移植後の細胞の生着と増殖が不可欠と考えられるため、安定性評価として、細胞生存率だけではなく細胞増殖活性が重要である。本事業においては、保管後のシート内上皮細胞の増殖活性を評価する方法としてコロニー形成試験を利用した。コロニー形成試験は、比較的簡便に細胞増殖活性を評価することが可能であり、評価方法として有用であることを確認した。また、一般に利用される冷蔵保管条件よりも常温保管条件の方が、製品の品質安定性の観点から、優れている可能性も明らかになった。今後の後続再生医療製品の開発においても、最終製品の安定性評価として、細胞生存率だけではなく細胞増殖活性評価を行うことで、より適切な安定性評価を実施できるものと考えられる。

本品の品質管理方法のグレードアップを目的として、工程内汚染管理を強化するために迅速無菌検査法を導入した。その結果、工程内に発生する各種検体の無菌検査が比較的簡便かつ迅速に実施できるようになった。本事業終了後に、規制当局と汚染管理方法について協議したところ、迅速無菌検査方法による工程内汚染管理には極めて肯定的であり、むしろ出荷試験としても、日本薬局方無菌試験に拘ることなく、迅速無菌検査方法の導入を検討するべきとの極めて貴重な見解を得た。

#### 4. まとめ

本事業においては、開発中の再生医療製品である培養自家口腔粘膜上皮シートの検証的治験を実施するために必要な課題を解決する過程を通じて、後続の再生医療製品の開発に有用な知見を得ることができた。本事業において取り組んだ課題は、すべて再生医療等製品に共通する一般的なものである。特に、最終製品の安定性評価と工程内汚染管理は、再生医療製品の製品化における最も重要な課題のひとつである。安定性評価への細胞増殖活性評価の導入は、今後の再生医療製品に関する不可欠な品質評価として定着する可能性があると考えられる。製品化のためには、遠隔地への輸送を含めた保管及び輸送安定性の評価が不可欠であり、今後の一般的かつ重要な課題である。また、工程内汚染管理及び出荷時無菌試験への迅速無菌検査の導入は、可能な限り早期に検査結果を入手するべきという規制当局の見解を考慮すると、今後の再生医療等製品の開発において重要な検討課題になるべきものと考えられる。