

平成 26 年度動物用再生医療等製品の安全性試験等開発事業
事業報告書

－動物用再生医療等製品（同種由来）の品質及び安全性確保に関する指針（素案）－

平成 27 年 3 月

動物用ワクチン-バイオ医薬品研究会

平成 26 年度動物用再生医療等製品の安全性試験等開発事業報告書

目 次

平成 26 年度動物用再生医療等製品の安全性試験等開発事業報告書	1
別添 1	
動物用再生医療等製品（同種由来）の品質及び安全性確保に関する 指針（素案）	6
別添 2	
ガイドライン素案作成のための情報収集	24
1) 臨床的ニーズのある製品群	24
2) 研究・開発が想定される動物用再生医療等製品	26
3) 各国或いは人用での既存のガイドライン	29
4) 研究・製造施設でのソフト・ハード要件	34
5) 再生医療等製品事業スキーム案	35
6) 再生医療等製品に関する情報	38
7) 再生医療等製品に関連する国際規格	39
8) 再生医療等製品に関するシンポジウムでのアンケート調査結果	41
9) 再生医療等製品に関するシンポジウムでの講演プロシーディング	47
10) 再生医療等製品製造（予定）施設見学の報告	65

平成 26 年度動物用再生医療等製品の安全性試験等開発事業 事業報告書

動物用ワクチン-バイオ医薬品研究会
会長 小沼 操

1. 事業目的

iPS 細胞などの多能性幹細胞の活用分野は、大きく再生医療分野と創薬応用になるといわれている。動物は人と異なり、試験動物として直接使用できるという利点があり、獣医療における先進的な応用が期待されるが、その中で平成 26 年 11 月に施行された改正薬事法では再生医療等製品というジャンルが新たに取り入れられ、その製造販売承認に、条件及び期限付き承認制度が導入されたことから、再生医療等製品が臨床現場へ提供されやすくなった。

動物用再生医療等製品では、がん療法に使用する製品や輸血用製品等の実用化が進められており、これらの製品の普及を図るためには、その特性を踏まえた安全性等の新たな基準作成が不可欠である。そこで、動物用再生医療等製品の安全性等基準の作成に寄与するため、それらの製品に関する情報を広く収集し、動物用再生医療等製品の品質及び安全性確保に関する指針素案の作成を行う。動物用再生医療等製品の開発に必要な試験方法とその評価法を明示した指針が作成されることにより、試験実施方法の定型化、審査基準の明確化が可能となり、当該製品の申請者の負担軽減及び審査の迅速化が図られる。

2. 事業内容

学識経験者や再生医療の専門家から成る検討委員会を組織し、動物用再生医療等製品に関する情報を収集するとともに、動物用再生医療等製品の品質及び安全性確保に関する指針素案を作成する。

1) 動物用再生医療等製品安全性試験等開発検討委員会の開催

専門家からなる「動物用再生医療等製品安全性試験等開発検討委員会」を設置し、事業方針を決定し、動物用再生医療等製品に関する情報収集及び動物用再生医療等製品の品質及び安全性確保に関する指針素案の検討を行う。

2) シンポジウムの開催

動物用再生医療等製品に関する情報を広く収集するため、シンポジウムを開催する。

3) 動物用再生医療等製品開発（予定）施設等の現地調査

動物用再生医療等製品の品質及び安全性確保に関する指針素案の作成に向けての情報収集のため、動物用再生医療等製品を実際に開発している施設、或いは動物用再生医療等製品開発にあたっての施設要件を満たしており、当該製品の開発を検討している施設について現地調査を行う。

3. 事業成果

動物用再生医療等製品安全性試験等開発検討委員会を開催し、動物用再生医療等製品（同種由来）の品質及び安全性確保に関する指針（素案）について、別添1のとおり取りまとめた。また再生医療に関連するシンポジウムにおけるアンケート調査、動物用再生医療等製品開発（予定）施設等の現地調査等により、当該指針（素案）の作成にあたって必要な情報を別添2（「1）臨床的ニーズのある製品群」、「2）研究・開発が想定される動物用再生医療等製品」、「3）各国或いは人用での既存のガイドライン」、「4）研究・製造施設でのソフト・ハード要件」、「5）再生医療等製品事業スキーム案」、「6）再生医療等製品に関する情報」、「7）再生医療等製品に関連する国際規格」）のとおり収集し、検討を行った。

1) 検討委員会の開催

（動物用再生医療等製品の品質及び安全性確保に関する指針（素案）の作成）

大学・研究機関等の学識経験者及び再生医療の専門家等から15名を選任し、「動物用再生医療等製品の品質及び安全性確保に関する指針（素案）」作成のため、検討委員会を9回（第1回：平成26年6月6日、第2回：平成26年7月17日、第3回：平成26年8月7日、第4回：平成26年9月12日、第5回：平成26年10月8日、第6回：平成26年12月10日、第7回：平成27年1月14日、第8回：平成27年2月16日、第9回：平成27年3月16日）開催し、当該指針（素案）の作成に必要な情報を収集して当該指針（素案）を作成した。なお、検討事項並びに検討委員については以下のとおりである。

[検討事項]

- 第1回：事業方針等の検討及び指針（素案）作成のために収集すべき情報の検討
- 第2回：再生医療等製品に関する情報の検討、再生医療等製品に関して収集すべき情報の検討
- 第3回：再生医療等製品に関する情報の検討、再生医療等製品に関して収集すべき情報の検討
- 第4回：作成すべき指針素案に関する検討、動物用再生医療等製品に関する調査結果に関する検討

第5回：指針素案の枠組みに関する検討、動物用再生医療等製品に関する調査結果に関する検討

第6回：指針素案の枠組みに関する検討、動物用再生医療等製品に関する調査結果に関する検討

第7回：指針素案の骨子に関する検討、動物用再生医療等製品に関する調査結果に関する検討

第8回：指針素案の骨子に関する検討

第9回：指針素案のまとめ

[検討委員]

稲葉 俊夫	公立大学法人大阪府立大学大学院生命環境科学研究科教授
犬丸 茂樹	独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所 動物疾病対策センター専門員
小沼 操	国立大学法人北海道大学名誉教授
岡田 邦彦	株式会社 J-ARM 代表取締役社長
笠嶋 快周	JRA 競走馬総合研究所臨床医学研究室上席研究役
岸上 義弘	日本獣医再生医療学会会長
木ノ下 千佳子	日本全薬工業株式会社研究開発本部開発部 開発薬事第2 チームチームリーダー
佐々木 伸雄	国立大学法人東京大学名誉教授
佐藤 陽治	国立医薬品食品衛生研究所再生・細胞医療製品部部長
嶋田 照雅	公立大学法人大阪府立大学生命環境科学域 附属獣医臨床センター教授
野村 明德	DS ファーマアニマルヘルス株式会社開発本部開発部主席部員
濱岡 隆文	一般財団法人生物科学安全研究所専務理事
平山 紀夫	麻布大学客員教授
山口 智宏	株式会社ケーナインラボ代表取締役
矢野 一男	旭化成メディカル株式会社医療製品開発本部臨床開発部 部長付 開発薬事アドバイザー

2) シンポジウムの開催

獣医学における研究者が最も多く参加する日本獣医学会学術集会において、動物用再生医療等製品に関する講演及びアンケート調査による情報収集を目的として、下記のプログラムでシンポジウムを開催し（テーマ：再生獣医療法の展望—新技術がもたらす可能性と課題—）、講演者及び参加者から広く情報を収集した。調査結果について

では、別添2の「8) 再生医療等製品に関するシンポジウムでのアンケート調査結果」のとおり、また講演プロシーディングについては別添2の「9) 再生医療等製品に関するシンポジウムでの講演プロシーディング」のとおりである。

シンポジウム「再生獣医療法の展望—新技術がもたらす可能性と課題—」

開催日：平成26年9月11日

開催地：北海道大学

I. 基調講演

1. 「日本の獣医再生医療の将来と問題点」
国立大学法人東京大学 佐々木 伸雄 氏
2. 「再生医療等製品の獣医療応用に向けて—法的位置づけと技術的課題—」
農林水産省動物医薬品検査所 能田 健 氏

II. iPS細胞がもたらす可能性

1. 「イヌ iPS細胞由来の血小板の作出」
公立大学法人大阪府立大学大学院 稲葉 俊夫 氏
2. 「iPS細胞由来肝細胞を用いた医薬品安全性評価」
国立医薬品食品衛生研究所 石田 誠一 氏

III. 再生獣医療法の臨床現場での課題

1. 「リンパ球を用いた細胞療法の現状とこれから」
公立大学法人大阪府立大学 嶋田 照雅 氏
2. 「骨再生と脊髄再生の実際」
日本獣医再生医療学会 岸上 義弘 氏
3. 「獣医療分野における細胞治療の提供体制について」
株式会社J-ARM 岡田 邦彦 氏
4. 「イヌの重度椎間板ヘルニアを原因とする急性期脊髄損傷に対する脊髄再生医療の効果」
倉敷芸術科学大学 田村 勝利 氏

3) 動物用再生医療等製品開発（予定）施設等の現地調査

動物用再生医療等製品を実際に開発している、或いは動物用再生医療等製品の開発にあたってその要件を満たす施設について、ハード・ソフト面を調査し、安全性試験法等ガイドライン素案作成に必要な情報を収集した。調査結果については、別添2の

「10) 再生医療等製品製造（予定）施設見学の報告」のとおりである。

動物用再生医療等製品（同種由来）の品質及び安全性確保に関する指針

はじめに

1．本指針は、動物用再生医療等製品のうち、同種由来細胞（自己由来のものを除く。）を加工したものの品質及び安全性の確保のための基本的な技術要件について定めるものである。

しかしながら、再生医療等製品の種類や特性、臨床上の適用法は多種多様であり、また、本分野における科学的進歩や経験の蓄積は日進月歩である。本指針を一律に適用したり、本指針の内容が必要事項すべてを包含しているとみなしたりすることが必ずしも適切でない場合もある。したがって、個々の再生医療等製品についての試験の実施や評価に際しては本指針の目的を踏まえ、その時点の学問の進歩を反映した合理的根拠に基づき、ケース・バイ・ケースで柔軟に対応することが必要であること。

2．製造販売承認申請時における品質及び安全性の確保のための資料は、本指針に沿って充実整備されることを前提としている。

しかしながら、当該製品の由来、対象疾患、対象患者、適用部位、適用方法及び加工方法等により資料の範囲及び程度が異なり、本指針では具体的に明らかなことも少なくないので、個別に動物用医薬品検査所に相談することが望ましい。

目次

第1章 総則	1
第1 目的	1
第2 定義	1
第2章 製造方法	2
第1 原材料及び製造関連物質	2
1 目的とする細胞・組織	2
(1) 起源及び由来、選択理由	2
(2) 原材料となる細胞・組織の特性と適格性	2
(3) ドナーに関する記録	2
(4) 細胞・組織の採取・保存・運搬	2
2 目的とする細胞・組織以外の原材料及び製造関連物質	3
(1) 細胞の培養を行う場合	3
(2) 非細胞成分と組み合わせる場合	5
(3) 細胞に遺伝子工学的改変を加える場合	5
第2 製造工程	6
1 ロット構成の有無とロットの規定	6
2 製造方法	6
(1) 受入検査	6
(2) 細菌、真菌及びウイルス等の不活化・除去	6
(3) 組織の細切、細胞の分離、特定細胞の単離等	7
(4) 培養工程	7
(5) 株化細胞の樹立と使用	7
(6) 細胞のバンク化	7
(7) 製造工程中の取り違い及びクロスコンタミネーション防止対策	7
3 加工した細胞の特性解析	8
4 最終製品の形態、包装	8
5 製造方法の恒常性	8
6 製造方法の変更	8
第3 最終製品の品質管理	8
1 総論	8
2 最終製品の品質管理法	9
(1) 細胞数並びに生存率	9

(2) 確認試験	9
(3) 細胞の純度試験	9
(4) 細胞由来の目的外生理活性物質に関する試験	9
(5) 製造工程由来不純物試験	10
(6) 無菌試験及びマイコプラズマ否定試験	10
(7) エンドトキシン試験	10
(8) ウイルス等の試験	11
(9) 効能試験	11
(10) 力価試験	11
(11) 力学的適合性試験	11
第3章 再生医療等製品の安定性	11
第4章 動物用再生医療等製品の安全性試験	12
1 総論	12
2 安全性に関する試験	12
(1) 動物	12
(2) 動物数	12
(3) 投与経路	13
(4) 投与量及び群分け	13
(5) 投与回数及び投与期間	13
(6) 観察及び検査項目	13
第5章 薬理試験	13
1 総論	13
2 薬効・薬理試験	14
第6章 体内動態	14
1 総論	14
2 体内分布	14
第7章 臨床試験を始めるにあたって	14
1 総論	14
2 臨床試験(治験実施計画書)	15

第1章 総則

第1目的

本指針は、動物用再生医療等製品のうち、同種由来細胞（自己由来のものを除く。）を加工したものの品質及び安全性の確保のための基本的な技術要件について定めるものである。

第2定義

本指針における用語の定義は以下のとおりとする。

1 「細胞の加工」とは、疾患の治療や組織の修復又は再建を目的として、細胞・組織の人為的な増殖・分化、細胞の株化、細胞の活性化等を目的とした薬剤処理、生物学的特性改変、非細胞成分との組み合わせ又は遺伝子工学的改変等を施すことをいう。組織の分離、組織の細切、細胞の分離、特定細胞の単離（薬剤等による生物学的・化学的な処理により分離するものを除く。）、抗生物質による処理、洗浄、ガンマ線等による滅菌、冷凍、解凍等は加工とみなさない（ただし、本来の細胞と異なる構造・機能を発揮することを目的として細胞を使用するものについてはこの限りではない。）。

2 「製造」とは、加工に加え、組織の分離、組織の細切、細胞の分離、特定細胞の単離、抗生物質による処理、洗浄、ガンマ線等による滅菌、冷凍、解凍等、当該細胞の本来の性質を改変しない操作を含む行為で、最終製品である再生医療等製品を出荷するまでに行う行為をいう。

3 「表現型」とは、ある一定の環境条件のもとで、ある遺伝子によって表現される形態学的及び生理学的な性質をいう。

4 「主要組織適合性抗原型タイピング」とは、各種動物の主要組織適合性抗原型のタイプを特定することをいう。

5 「ドナー」とは、再生医療等製品の原料となる細胞・組織を提供する動物個体をいう。

6 「遺伝子導入構成体」とは、目的遺伝子を標的細胞に導入するための運搬体、目的遺伝子及びその機能発現に必要な要素をコードする塩基配列等から構成されるものをいう。

第2章 製造方法

第1 原材料及び製造関連物質

1 目的とする細胞・組織

(1) 起源及び由来、選択理由

原材料として用いられる細胞・組織の起源及び由来について説明し、当該細胞・組織を選択した理由を明らかにすること。

(2) 原材料となる細胞・組織の特性と適格性

① 生物学的構造・機能の特徴と選択理由

原材料として用いられる細胞・組織について、その生物学的構造・機能の特徴を示し、当該細胞・組織を原料として選択した理由を説明すること。

② ドナーの選択基準、適格性

ドナーが倫理的及び動物福祉及び公衆衛生の観点から適切に選択されたことを示すこと。また、選択基準、適格性基準を定め、その妥当性を明らかにすること。

③ ドナーの主要組織適合性抗原のタイプの特定

免疫適合性を考慮し、必要に応じてドナーの主要組織適合性抗原のタイピングを明らかにすること。タイピングを実施しない場合は、妥当性を明らかにすること。

(3) ドナーに関する記録

原材料となる細胞について、安全性確保上必要な情報が確認できるよう、ドナーに関する記録が整備、保管されていること。また、その具体的方策を示すこと。

(4) 細胞・組織の採取・保存・運搬

① 採取者及び採取診療施設等の適格性

採取者及び採取診療施設等に求めるべき技術的要件について、明らかにすること。

② 採取部位及び採取方法の妥当性

細胞・組織の採取部位の選定基準、採取方法を示し、これらが科学的及び倫理的に適切に選択されたものであることを明らかにすること。採取方法については、用いられる器具、微生物汚染防止、取り違えやクロスコンタミネーション防止のための方策等を具体的に示すこと。

③ ドナーの飼い主に対する説明及び同意

細胞・組織採取時のドナーの飼い主に対する説明及び同意の内容を規定すること。

④ドナーの飼い主の個人情報の保護

ドナーの飼い主の個人情報の保護方策について具体的に規定すること。

⑤ドナーの安全性確保のための試験検査

細胞採取時にドナーの安全性確保のために採取部位の状態の確認など試験検査を行わなければならない場合には、その内容、検査結果等に問題があった場合の対処法について具体的に規定すること。

⑥保存方法及び取り違え防止策

採取した細胞・組織を一定期間保存する必要がある場合には、保存条件や保存期間及びその設定の妥当性について明らかにすること。また、取り違えを避けるための手段や手順等について具体的に説明すること。

⑦運搬方法

採取細胞・組織を運搬する必要がある場合には、運搬容器、運搬手順(温度管理等を含む。)を定め、その妥当性について明らかにすること。

⑧記録の作成及び保管方法

①～⑦に関する事項について、実施の記録を文書で作成し、適切に保管する方法について明らかにすること。

2 目的とする細胞・組織以外の原材料及び製造関連物質

目的とする細胞・組織以外の原材料及び製造関連物質を明らかにし、その適格性を示すとともに、必要に応じて規格を設定し、適切な品質管理を行うことが必要である。

なお、他動物種由来製品を原材料として使用する場合は、その使用量を必要最小限とし、「動物用生物由来原料基準(平成15年農林水産省告示第1911号)」をはじめとする関連法令及び通知を遵守すること。特に、ウイルス不活化及び除去に関する情報を十分に評価する必要があるほか、遡及調査等を確保する方策についても明らかにすること。

(1) 細胞の培養を行う場合

①培地、添加成分(血清、成長因子及び抗生物質等)及び細胞の処理に用いる試薬等のすべての成分等についてその適格性を明らかにし、必要に応じて規格を設定すること。各成分等の適格性の判定及び規格の設定に当たっては、最終製品の適用経路等を考慮すること。

②培地成分については、以下の点に留意すること。

ア 培地に使用する成分及び水は、可能な範囲で動物用医薬品に相当する基準で品質管理されている生物学的純度の高い品質のものを使用すること。

イ 培地に使用する成分は主成分のみでなく可能な限り使用するすべての成分について明

らかにし、必要に応じて品質管理法等を明確にすること。ただし、培地の構成成分が周知のもので、市販品等が一般的に使用されているDMEM、MCDB、HAM、RPMI のような培地は1つのものと考えてよい。

ウ すべての成分を含有した培地の最終品については、無菌性及び目的とした培養に適していることを判定する必要がある。必要に応じてそのための性能試験を実施する。その他、工程管理上必要と思われる試験項目を規格として設定し、適切な品質管理を行う必要がある。

③血清及び血清に由来する成分については、以下の点を考慮し、血清等からの細菌、真菌、ウイルス及び異常プリオン等の混入・伝播を防止するとともに、最終製品から可能な限り除去するよう洗浄や処理方法等を検討すること。なお、異種血清を使用する場合でも無血清培養に用いる添加タンパク質との安全性比較をし、十分に除去されることが立証される場合には、その使用を妨げるものではない。特に繰り返して使用する可能性のある製品では可能な限り安全性に留意すること。

ア 血清等の由来を明確にすること。

イ 由来動物種に特異的なウイルスやマイコプラズマに関する適切な否定試験を行い、ウイルス等に汚染されていないことを確認した上で使用すること。

ウ 細胞の活性化、増殖に影響を与えない範囲で細菌、真菌及びウイルス等に対する適切な不活化処理及び除去処理を行う。例えば、潜在的なウイルス混入の危険性を避けるために、必要に応じて加熱処理、フィルター処理、放射線処理又は紫外線処理等を組み合わせて行うこと。

エ 培養細胞でのウイルス感染のモニター、患畜レベルでのウイルス性疾患の発症に対するモニター及び異種血清成分に対する抗体産生等の調査のために、使用した血清の一部を保管すること。

④抗生物質の使用は必要最小限とする。ただし製造初期の工程において抗生物質の使用が不可欠と考えられる場合には、その後の工程で可能な限り漸減を図るほか、用いる抗生物質に過敏症の既往歴のある患畜の場合には、十分に注意すること。なお、抗生物質を使用する場合でも十分に除去されることが立証される場合には、その使用を妨げるものではない。

⑤成長因子を用いる場合には、細胞培養特性の再現性を保証するために、例えば純度及び力価に関する規格を設定する等適切な品質管理法を示すこと。

⑥最終製品に含有している可能性のある培地成分や操作のために用いられたその他の成分、増殖機器等については、生体に悪影響を及ぼさないものを選択すること。

⑦フィーダー細胞として異種動物由来の細胞を用いる場合には、異種動物由来の感染症のリスクの観点から安全性を確保すること。

(2) 非細胞成分と組み合わせる場合

①細胞以外の原材料の品質及び安全性について

細胞とともに最終製品の一部を構成する細胞以外の原材料(マトリックス、医療材料、スキャフォールド、支持膜、ファイバー及びビーズ等)がある場合には、その品質及び安全性に関する知見について明らかにすること。

当該原材料の種類と特性、最終製品における形態・機能及び想定される臨床適応の観点から見た品質、安全性及び有効性評価との関連を勘案して、適切な情報を提供すること。生体吸収性材料を用いる場合には、分解生成物に関して必要な試験を実施すること。

②目的とする細胞との相互作用について

細胞との相互作用に関し、以下の事項について、確認方法及び確認結果を示すこと。

ア 非細胞成分が、想定される臨床適応に必要な細胞の機能、生育能力、活性及び安定性に悪影響を与えないこと。

イ 非細胞成分との相互作用によって起こり得る、細胞の変異、形質転換及び脱分化等を考慮し、その影響を可能な範囲で評価すること。

ウ 細胞との相互作用によって、想定される臨床適応において非細胞成分に期待される性質が損なわれないこと。

③細胞と適用部位を隔離する目的で非細胞成分を使用する場合

非細胞成分を細胞と適用部位を隔離する目的で使用する場合、下記の項目を参考に効果、安全性を確認すること。

ア 免疫隔離の程度

イ 細胞由来の目的生理活性物質の膜透過キネティクスと薬理効果

ウ 栄養成分及び排泄物の拡散

エ 非細胞成分が適用部位周辺に及ぼす影響

(3) 細胞に遺伝子工学的改変を加える場合

細胞に遺伝子を導入する場合は、次に掲げる事項に関する詳細を示すこと。

①目的遺伝子の構造、由来、入手方法、クローニング方法並びにセル・バンクの調製方法、管理方法及び更新方法等に関する情報

②導入遺伝子の性質

③目的遺伝子産物の構造、生物活性及び性質

④ 遺伝子導入構成体を作製するために必要なすべての原材料、性質及び手順（遺伝子導入法並びに遺伝子導入用ベクターの由来、性質及び入手方法等）

⑤ 遺伝子導入構成体の構造や特性

⑥ ベクターや遺伝子導入構成体を作製するための細胞やウイルスのバンク化及びバンクの管理方法

遺伝子導入細胞の製造方法については、その設定の妥当性を明らかにすること。

なお、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(平成15年法律第97号)に基づき、「ヒトの細胞等」若しくは「分化する能力を有する、又は分化した細胞等であって、自然条件において個体に成育しないもの」以外の細胞、「ウイルス」及び「ウイロイド」に対して遺伝子工学的改変を加える場合には、別途手続きが必要となるので留意すること。

第2 製造工程

再生医療等製品の製造に当たっては、製造方法を明確にし、可能な範囲でその妥当性を以下の項目で検証し、品質の一定性を保持すること。

1 ロット構成の有無とロットの規定

製品がロットを構成するか否かを明らかにすること。ロットを構成する場合には、ロットの内容について規定しておくこと。

2 製造方法

原材料となる細胞・組織の受け入れから最終製品に至る製造の方法の概要を示すとともに、具体的な処理内容及び必要な工程管理、品質管理の内容を明らかにすること。

(1) 受入検査

原材料となる細胞・組織について、その種類や使用目的に応じて実施する受入のための試験検査の項目と各項目の判定基準を設定すること。

(2) 細菌、真菌及びウイルス等の不活化・除去

原材料となる細胞・組織について、その細胞生存率や表現型、遺伝形質及び特有の機能その他の特性及び品質に影響を及ぼさない範囲で、必要かつ可能な場合は細菌、真菌及びウイルス等を不活化又は除去する処理を行うこと。当該処理に関する方策と評価方法につい

て明らかにすること。

(3) 組織の細切、細胞の分離、特定細胞の単離等

原材料となる細胞・組織から製品を製造する初期の過程で行われる組織の細切、細胞の分離、特定細胞の単離及びそれらの洗浄等の方法を明らかにすること。特定細胞の単離を行う場合には、その確認方法を設定すること。

(4) 培養工程

製造工程中に培養工程が含まれる場合は、培地、培養条件、培養期間及び収率等を明らかにすること。

(5) 株化細胞の樹立と使用

株化細胞の樹立に当たっては、ドナーの遺伝的背景を理解したうえで樹立すること。樹立の方法を明確にし、可能な範囲でその妥当性を明らかにすること。

株化細胞の品質の均質性および安定性を保持するため、必要な特性解析要件（細胞純度、形態学的評価、表現型特異的マーカ、核型など）を同定してその基準を設定するとともに、安定性を維持したまま増殖が可能な継代数を示すこと。

株化細胞に関しては、適切な動物モデル等を利用し、腫瘍形成及びがん化の可能性について考察し、明らかにすること。

(6) 細胞のバンク化

再生医療等製品の製造のいずれかの過程で、細胞をバンク化する場合には、その理由、セル・バンクの作製方法及びセル・バンクの特性解析、保存・維持・管理方法・更新方法その他の各作業工程や試験に関する手順等について詳細を明らかにし、妥当性を示すこと。

平成12年7月14日付け医薬審第873号厚生省医薬安全局審査管理課長通知「生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品 / 生物起源由来医薬品）製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析について」等を参考とすること。

(7) 製造工程中の取り違え及びクロスコンタミネーション防止対策

再生医療等製品の製造にあたっては、製造工程中の取り違え及びクロスコンタミネーションの防止が重要であり、工程管理における防止対策を明らかにすること。

3 加工した細胞の特性解析

加工した細胞について、加工に伴う変化を調べるために、例えば、形態学的特徴、増殖特性、生化学的指標、免疫学的指標、特徴的産生物質、その他適切な遺伝型又は表現型の指標を解析するとともに、必要に応じて機能解析を行うこと。また、培養期間の妥当性及び細胞の安定性を評価するために、予定の培養期間を超えて培養した細胞において目的外の変化がないことを示すこと。

4 最終製品の形態、包装

最終製品の形態、包装は、製品の品質を確保できるものでなければならない。

5 製造方法の恒常性

再生医療等製品の製造に当たっては、製造工程を通じて、個別に加工した製品の細胞数、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（表現型の適切な指標、遺伝型の適切な指標、機能特性及び目的とする細胞の含有率等）が製品（ロット）間で本質的に損なわれないことを、試験的検体を用いてあらかじめ評価しておくこと。製造工程中の凍結保存期間や加工に伴う細胞培養の期間が長期に及ぶ場合には一定期間ごとに無菌試験を行うなど、無菌性が確保されることを確認すること。

6 製造方法の変更

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承認申請に使用するときは、製造方法変更前後の製品の同等性及び同質性を示すこと。

第3 最終製品の品質管理

1 総論

再生医療等製品の品質管理全体の方策としては、最終製品の規格及び試験方法の設定、個別患者への適用ごとの原材料の品質管理、製造工程の妥当性の検証と一定性の維持管理のほか、中間製品の品質管理を適正に行うこと等が挙げられる。

最終製品の規格及び試験方法については、対象とする細胞・組織の種類及び性質、製造方法、各製品の使用目的や使用方法、安定性、利用可能な試験法等によって異なると考えられるため、取り扱う細胞・組織によってこれらの違いを十分に考慮して設定すること。また、製造工程の妥当性の検証と一定性の維持管理法、中間製品の品質管理等との相互補完関係を考慮に入れて、全体として品質管理の目的が達成されるとの観点から、合理的に規

格及び試験方法を設定し、その根拠を示すこと。なお、無菌性やマイコプラズマの否定など必須なものを除き、治験後に臨床試験成績と品質の関係を論ずるために必要な品質特性については、やむを得ない場合は少数の試験的検体の実測値をもとにその変動をしかるべき範囲内に設定する暫定的な規格及び試験方法を設定することで差し支えない。ただし、規格及び試験方法を含む品質管理法は治験の進行とともに充実・整備を図ること。

2 最終製品の品質管理法

最終製品について、以下に示す一般的な品質管理項目及び試験を参考として、必要で適切な規格及び試験方法を設定し、その根拠を明らかにすること。

ロットを構成しない製品を製造する場合は個別製品ごとに、ロットを構成する製品を製造する場合には、通常、各個別製品ではなく各ロットが品質管理の対象となるので、これを踏まえてそれぞれ適切な規格、試験方法を設定すること。

(1) 細胞数並びに生存率

得られた細胞の数と生存率は、最終製品又は必要に応じて適切な製造工程の製品で測定すること。なお、治験開始時においては、少数の試験的検体での実測値を踏まえた暫定的な規格を設定することでも良い。

(2) 確認試験

目的とする細胞の形態学的特徴、生化学的指標、免疫学的指標、特徴的産生物質その他適切な遺伝型あるいは表現型の指標を選択して、目的とする細胞であることを確認すること。

(3) 細胞の純度試験

目的細胞以外の異常増殖細胞、形質転換細胞の有無や混入細胞の有無等の細胞の純度について、目的とする細胞の由来、培養条件等の製造工程等を勘案し、必要に応じて試験項目、試験方法及び判定基準を示すこと。なお、治験開始時においては、少数の試験的検体での実測値を踏まえた暫定的な規格を設定することでも良い。

(4) 細胞由来の目的外生理活性物質に関する試験

細胞由来の各種目的外生理活性物質のうち、製品中での存在量如何で患者に安全性上の重大な影響を及ぼす可能性が明らかに想定される場合には、適切な許容量限度試験を設定すること。なお、治験開始時においては、少数の試験的検体での実測値を踏まえた暫定的な規格を設定することでも良い。

(5) 製造工程由来不純物試験

原材料に存在するか又は製造過程で非細胞成分、培地成分、資材、試薬等に由来し、製品中に混入物、残留物、又は新たな生成物、分解物等として存在する可能性があるもので、かつ、品質及び安全性の面からみて望ましくない物質等（例えば、ウシ胎児血清由来のアルブミン、抗生物質等）については、当該物質の除去に関するプロセス評価や当該物質に対する工程内管理試験の結果を考慮してその存在を否定するか、又は適切な試験を設定して存在許容量を規定すること。試験対象物質の選定及び規格値の設定に当たっては、設定の妥当性について明らかにすること。なお、治験開始時においては、少数の試験的検体での実測値を踏まえた暫定的な規格を設定することでも良い。

(6) 無菌試験及びマイコプラズマ否定試験

最終製品の無菌性については、あらかじめモデル検体を用いて全製造工程を通じて無菌性を確保できることを十分に評価しておく必要がある。最終製品について、患畜に適用する前に無菌性（一般細菌及び真菌否定）を試験により示すこと。また、適切なマイコプラズマ否定試験を実施すること。最終製品の無菌試験等の結果が、患畜への投与後にしか得られない場合には、投与後に無菌性等が否定された場合の対処方法をあらかじめ設定しておくこと。また、この場合、中間製品で無菌性を試験により示し、最終製品に至る工程の無菌性を厳密に管理する必要がある。また、同一施設・同一工程で以前に他の患畜への適用例がある場合には、全例において試験により無菌性が確認されていること。

ロットを構成する製品で密封性が保証されている場合には、代表例による試験でよい。適用ごとに試験を実施する必要がある場合で、無菌試験等の結果が、患畜への投与後にしか得られない場合には、適用の可否は直近のデータを参考にすることになるが、この場合でも最終製品の無菌試験等は必ず行うこと。

抗生物質は細胞培養系で極力使用しないことが望まれるが、使用した場合には、無菌試験に影響を及ぼさないよう処置すること。

(7) エンドトキシン試験

試料中の夾雑物の影響を考慮して試験を実施すること。規格値は必ずしも実測値によらず、日本薬局方等で示されている最終製品の1回投与量を基にした安全域を考慮して設定すればよい。また、工程内管理試験として設定することも考えられるが、その場合には、バリデーションの結果を含めて基準等を設定し、その妥当性を説明すること。

(8) ウイルス等の試験

動物福祉上又は公衆衛生上のリスクが高いと考えられるウイルス等を製造工程中に増殖させる可能性のある細胞を用いる際であって、当該細胞がバンク化されておらずウインドウピリオドが否定できない場合には、中間製品、最終製品等についてもウイルス等の存在を否定する適切な試験を実施すること。また、製造工程中で生物由来成分を使用する場合には、最終製品で当該成分由来のウイルスについての否定試験の実施を考慮すべき場合もあるかも知れない。しかし可能な限り、もとの成分段階での試験やプロセス評価で迷入が否定されていることが望ましい。

(9) 効能試験

幹細胞、リンパ球、遺伝子改変細胞その他の細胞等、臨床使用目的又は特性に応じた適切な効能試験の実施を考慮すべき場合もある。なお、治験開始時においては、少数の試験的検体による実測値を踏まえた暫定的な規格を設定することでも良い。

(10) 力価試験

細胞から分泌される特定の生理活性物質の分泌が当該再生医療等製品の効能又は効果の本質である場合には、その目的としている必要な効果を発揮することを示すために、当該生理活性物質に関する検査項目及び規格を設定すること。遺伝子を導入した場合の発現産物又は細胞から分泌される目的の生成物等について、力価、産生量等の規格を設定すること。なお、治験開始時においては、少数の試験的検体による実測値を踏まえた暫定的な規格を設定することでも良い。

(11) 力学的適合性試験

一定の力学的強度を必要とする製品については、適用部位を考慮した力学的適合性及び耐久性を確認するための規格を設定すること。なお、治験開始時においては、少数の試験的検体による実測値を踏まえた暫定的な規格を設定することでも良い。

第3章 再生医療等製品の安定性

製品化した再生医療等製品又は重要なそれらの中間製品について、保存・流通期間及び保存形態を十分考慮して、細胞の生存率及び力価等に基づく適切な安定性試験を実施し、貯法及び有効期限を設定し、その妥当性を明らかにすること。特に凍結保管及び解凍を行う

場合には、凍結及び解凍操作による製品の安定性や規格への影響がないかを確認すること。また、必要に応じて標準的な製造期間を超える場合や標準的な保存期間を超える長期保存についても検討し、安定性の限界を可能な範囲で確認すること。ただし、製品化後直ちに使用するような場合はこの限りではない。

また、製品化した再生医療等製品を運搬する場合には、運搬容器及び運搬手順（温度管理等を含む）等を定め、その妥当性について明らかにすること。

第4章 動物用再生医療等製品の安全性試験

1 総論

製品の対象となる製品を用いて、臨床上の適用に関連する有用な安全情報を収集すること。動物用医薬品の安全性試験については、①動物用医薬品のための安全性試験法ガイドライン、②動物用生物学的製剤を除く動物用医薬品の対象動物安全性試験（VICHGL43）及び③動物用生及び不活化ワクチンの対象動物安全性試験（VICHGL44）（農林水産省動物医薬品検査所長通知 平成12年3月31日付け12動薬A第418号の別添2：動物用医薬品等の承認申請資料のためのガイドライン等の10）に詳細が示されているので、動物用再生医療等製品についての安全性試験は、当該製品の特性に応じてこれらの試験法を応用することが望ましい。ここでは標準的な試験法を示す。なお、対象動物を用いる本試験は、動物用再生医療等製品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令（平成26年農林水産省令第60号）に従って実施しなければならない。また、異種遺伝子が導入された細胞を使用する場合は、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成15年法律第97号）に従うこと。

2 安全性に関する試験

（1）動物

製品の適用を予定している健康な対象動物であって、飼料及び動物用医薬品の使用歴並びに試験開始前における飼養方法等が明らかなものを用いる。製品の適用に性別の限定がない場合には、雌雄を用いること。妊娠動物への適用が予定されている場合には、妊娠動物を用いること。

（2）動物数

各群について3頭以上を用いる。

(3) 投与経路

原則として臨床適用経路とするが、複数ある場合には障害が最も強く発現する経路で実施して差し支えない。

(4) 投与量及び群分け

試験群及び対照群を置く。試験群の投与量は、臨床適用量とする。ただし臨床的用量に幅がある場合は、その最も多い量を投与する。なお、必要に応じ高用量群を設定する場合は、臨床適用量の10倍程度を投与すること。

(5) 投与回数及び投与期間

予定している投与期間及び投与回数で投与した後、適当な間隔をおいてさらにもう1回投与する。ただし予定している投与期間が長期の場合は、投与期間を短縮して差し支えない。

(6) 観察及び検査項目

①動物の観察

投与後における一般状態を多角的に毎日観察し記録する。その際、製品及び導入遺伝子の発現産物等による望ましくない免疫反応が生じる可能性についても検討又は考察すること。

②血液検査

必要により全部又は一部について、血液学的検査及び血液生化学的検査を実施する。

③妊娠動物

妊娠動物に対する適用を予定している製品については、試験に用いた妊娠動物の産子についても投与群に準じて観察を行うこと。

④その他

必要に応じて、製品の適用が患畜の正常な細胞・組織に影響を与える可能性及びウイルスベクターを使用した場合には増殖性ウイルスの存在程度について検討又は考察すること。

第5章 薬理試験

1 総論

動物用再生医療等製品の効力又は性能を推定するための薬理情報を収集すること。通常の医薬品で求められる最小有効量に関する試験等は、実施する必要はない場合がある。な

お、動物用再生医療等製品の効力又は性能による治療が他の治療法と比較したとき、はるかに優れて期待できることが国内外の文献又は知見等により合理的に明らかにされている場合には、必ずしも詳細な実験的検討は必要とされない。

2 薬効・薬理試験

①技術的に可能かつ科学的に合理性のある範囲で、対象動物、実験動物又は細胞等を用い、適切に設計された試験により、動物用再生医療等製品の機能発現、作用持続性及び効果を検討すること。

②遺伝子導入細胞にあつては、導入遺伝子からの目的産物の発現効率及び発現の持続性、導入遺伝子の発現産物の生物活性並びに動物用再生医療等製品として期待される効果等を検討すること。

③適当な動物由来細胞製品モデル又は疾患モデル動物がある場合には、それを用いて治療効果を検討し、臨床適用における用法・用量の設定を検討すること。飼い主の所有する患者を用いる場合は、臨床試験としての実施が必要な場合がある。

第6章 体内動態

1 総論

動物用再生医療等製品が有効で安全であることの傍証となる情報を収集すること。これらの情報を得るために既に実施した試験あるいは文献情報等を利用して差し支えない。

2 体内分布

①製品を構成する細胞及び導入遺伝子の発現産物について、技術的に可能で、かつ、科学的合理性がある範囲で、対象動物又は実験動物での体内分布を明らかにすること。

②当該細胞が特定の部位（組織等）に到達して作用する場合には、その局在性を明らかにすること。

第7章 臨床試験を始めるにあたって

1 総論

動物用再生医療等製品の有効性の確認又は推定及び安全性を評価することが可能な試験

成績を得るために、当該製品に応じた適切な試験デザイン及びエンドポイントを設定して実施すること。なお、臨床試験は、動物用再生医療等製品の臨床試験の実施の基準に関する省令（平成26年農林水産省令第61号）に従って実施しなければならない。

2 臨床試験（治験実施計画書）

臨床試験を実施する際には、以下のことを考慮して治験実施計画書を作成すること。

- ①対象疾患
- ②対象とする被験動物及び被験動物から除外すべき患畜の考え方
- ③再生医療等製品の適用を含め、被験動物に対して行われる治療内容
- ④既存の治療法との比較を踏まえた臨床試験実施の妥当性
- ⑤現在得られている情報から想定されるリスク及びベネフィットを含め、被験動物の飼主への説明事項の案

ガイドライン素案作成のための情報収集

1) 臨床的ニーズのある製品群（自己、非自己）

①細胞免疫療法

- *活性化 T リンパ球、CD4、CD8 など選択的な細胞群も含む
- *樹状細胞、樹状細胞+活性化 T リンパ球も含む
- *活性化 NK 細胞、TNK 細胞
- *iPS 細胞由来抗原特異的 T リンパ球
- *iPS 細胞由来血小板
- *iPS 細胞由来赤血球

②組織再生

- *脂肪組織由来幹細胞
- *骨髄幹細胞（骨髄間葉系幹細胞）
- *骨膜由来間葉系幹細胞
- *軟骨細胞
- *末梢血間葉系幹細胞
- *皮膚細胞
- *角膜細胞
- *口腔粘膜上皮細胞
- *心筋細胞
- *iPS 細胞
- *ES 細胞
- *患者 iPS 細胞由来疾患原因遺伝子修復細胞

Urinary bladder matrix (UBM)等の脱細胞化組織

ブタの膀胱粘膜から作られたシートあるいは粉状の製品。基本的にはコラーゲンを主体とした組織治癒過程の足場の役割を担う。しかし、中には、この足場から組織修復に有用な成長因子が徐放されると謳っている場合もある。

適応症は外傷、角膜損傷、歯牙疾患、整形外科（腱・靭帯損傷、関節炎、骨折等）。対象動物は犬・猫・馬・エキゾチックアニマル等。

また、人でも同様の製品が販売されている。

参考 URL : <http://www.acellvet.com/>

IRAP (Interleukin-1 Receptor Antagonist Protein)

外傷性あるいは進行性の関節炎では炎症性タンパクであるインターロイキン 1 (IL-1) による軟骨や滑膜の変性が誘発される。IRAP は IL-1 レセプターを介した競合的阻害による抗炎症作用を期待して、関節炎の治療に応用されている。対象動物は主に犬・馬。

患畜の血液を特殊なガラスビーズを含んだシリンジで採血し、24 時間インキュベートする。その後、アンタゴニストを多く含んだ血漿を抽出し、関節内へ投与する。血漿は-80 度で保存可能。

参考 URL : http://www.ssequineclinic.com/pages/services_irap.html

2) 研究・開発が想定される動物用再生医療等製品

国内	基礎研究		文献	院内製剤または治験			製品の 実用化	文献
	細胞の種類	適応		細胞の種類	メーカー	適応		
ES細胞	馬ES細胞の作製		1,R2	なし			なし	
	犬猫ES細胞の作製		2,R3					
iPS細胞	犬iPS細胞由来血小板および神経幹細胞、猫iPS細胞由来赤芽球を作製		3	なし			なし	
MSC等の 体性 幹細胞	馬骨髄由来幹細胞(自家移植)	屈腱炎 骨・関節 軟骨疾患	4,5	犬骨髄由来幹細胞(自家移植)	J-ARM社培養キット		なし	R1
	犬骨髄幹細胞由来肝細胞の作製		6	犬脂肪由来幹細胞(自家移植)	J-ARM社培養キット ZENOAQ社培養キ ット		なし	R1
	犬羊膜幹細胞由来角膜上皮細胞の作製		7	犬脂肪由来幹細胞(他家移植)	アニマルステムセル社	脊髄損傷 重症肝疾 患	なし	
	犬歯髄由来幹細胞(他家移植)	歯欠損モ デル	8					
	犬骨髄由来幹細胞導入人工骨(自家移植)	骨欠損モ デル	9					
	犬骨髄由来幹細胞導入人工血管(自家移植)	下大静脈 移植モデル	10					

国外	基礎研究		文献	院内製剤または治験			製品の 実用化	文献
	細胞の種類	適応		細胞の種類	メーカー	適応		
ES細胞	馬ES細胞(他家移植)	浅指屈筋 腱損傷	11、R2	なし			なし	
	犬ES細胞由来神経を作製		12					
iPS細胞	馬iPS細胞の作製		13、R4	なし			なし	
	犬iPS細胞由来内皮細胞を作製		14、R5					
	犬iPS細胞由来間葉系間質細胞を作製		R6					
MSC等の 体性 幹細胞	馬羊膜由来幹細胞(他家移植)	腱・靭帯 損傷	15	馬脂肪由来幹細胞(自家移植)	米国Vet-Stem社	屈腱炎	なし	R1
	馬胎盤由来幹細胞(他家移植)	健常馬	16					
	犬骨髄由来幹細胞(他家移植)	健常犬	17	犬骨髄由来幹細胞(自家移植)	英国VetCell社		なし	R1
	犬臍帯血由来幹細胞(他家移植)	骨欠損、 脊髄損傷 モデル	18,19	犬脂肪由来幹細胞(自家移植)	米国Vet-Stem社、 英国VetCell社、 韓国RNL-BIO社	関節炎、 脊髄損傷	なし	R1
	猫脂肪由来幹細胞(他家移植)	慢性腎臓 病	20	犬脂肪由来幹細胞(他家移植)	豪州Regeneus社	骨関節炎	なし	R1

原著論文

- 1 Saito S, Ugai H, Sawai K, Yamamoto Y, Minamihashi A, Kurosaka K, Kobayashi Y, Murata T, Obata Y, Yokoyama K. Isolation of embryonic stem-like cells from equine blastocysts and their differentiation in vitro. *FEBS Lett.* 531(3):389-96, 2002.
- 2 Hatoya S, Torii R, Kondo Y, Okuno T, Kobayashi K, Wijewardana V, Kawate N, Tamada H, Sawada T, Kumagai D, Sugiura K, Inaba T. Isolation and characterization of embryonic stem-like cells from canine blastocysts. *Mol Reprod Dev.* 73(3): 298-305, 2006.
- 3 Nishimura T, Hatoya S, Kanegi R, Sugiura K, Wijewardana V, Kuwamura M, Tanaka M, Imai J, Izawa T, Takahashi M, Kawate N, Tamada H, Imai H, Inaba T. Generation of Functional Platelets from Canine Induced Pluripotent Stem Cells. *22(14): 2026-35, 2013.*
- 4 Neo S, Ishikawa T, Ogiwara K, Kansaku N, Nakamura M, Watanabe M, Hisasue M, Tsuchiya R, Yamada T. Canine bone marrow cells differentiate into hepatocyte-like cells and placental hydrolysate is a potential inducer. *Res Vet Sci.* 87: 1-6, 2009.
- 5 Seo JP, Tsuzuki N, Haneda S, Yamada K, Furuoka H, Tabata Y, Sasaki N. Osteoinductivity of gelatin/ β -tricalcium phosphate sponges loaded with different concentrations of mesenchymal stem cells and bone morphogenetic protein-2 in an equine bone defect model. *Vet Res Commun.* 38(1): 73-80, 2014.
- 6 臨床医学研究室. 競走馬臨床における再生医療技術導入に関する研究. 競走馬総合研究所年報 2012年
- 7 Nam E, Takahashi A, Fujita N, Tsuzuki K, Nishimura R. Cultivation of corneal epithelial cell sheets on canine amniotic membrane. *Vet Ophthalmol.* 16(4): 263-8, 2013.
- 8 山田陽一、上田実, 歯髄幹細胞による骨再生と臨床応用の可能性, 医学のあゆみ, 231巻 11号, 2009年
- 9 Doi K, Kubo T, Hayashi K, Imura K, Akagawa Y. Development of cell-hybrid artificial bone: effect of osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells on bone formation with newly developed interconnected porous calcium hydroxyapatite. *Dent Mater J.* 26(2):162-9, 2007.
- 10 Matsumura G, Ishihara Y, Miyagawa-Tomita S, Ikada Y, Matsuda S, Kurosawa H, Shin'oka T. Evaluation of tissue-engineered vascular autografts. *Tissue Eng.* 12(11): 3075-83, 2006.
- 11 Guest DJ1, Smith MR, Allen WR. Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon. *Equine Vet J.* 42(7):636-42, 2010.
- 12 Wilcox JT, Lai JKY, Semple E, Brisson BA, Gartley C, Armstrong JN, Betts DH. Synaptically-competent neurons derived from canine embryonic stem cells by lineage selection with EGF and Noggin. *PLoS ONE* 6(5): e19768, 2011.
- 13 Breton A1, Sharma R, Diaz AC, Parham AG, Graham A, Neil C, Whitelaw CB, Milne E, Donadeu FX. Derivation and characterization of induced pluripotent stem cells from equine fibroblasts. *Stem Cells Dev.* 22(4): 611-2, 2013.
- 14 Lee AS, Xu D, Plews JR, Nguyen PK, Nag D, Lyons JK, Han L, Hu S, Lan F, Liu J, Huang M, Narsinh KH, Long CT, de Almeida PE, Levi B, Kooreman N, Bangs C, Pacharinsak C, Ikeno F, Yeung AC, Gambhir SS, Robbins RC, Longaker MT, Wu JC. Preclinical derivation and imaging of autologously transplanted canine induced pluripotent stem cells. *J Biol Chem.*286(37): 32697-704, 2011.
- 15 Lange-Consiglio A1, Tassan S, Corradetti B, Meucci A, Perego R, Bizzaro D, Cremonesi F. Investigating the efficacy of amnion-derived compared with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in equine tendon and ligament injuries. *Cytherapy.* 15(8):1011-20, 2013.
- 16 Carrade DD1, Owens SD, Galuppo LD, Vidal MA, Ferraro GL, Librach F, Buerchler S, Friedman MS, Walker NJ, Borjesson DL. Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. *Cytherapy.* 13(4):419-30, 2011.
- 17 Xie F, Teng L, Wang Q, Sun XJ, Cai L, Zeng HF, Xiao R. Ectopic osteogenesis of allogeneic bone mesenchymal stem cells loading on β -tricalcium phosphate in canines. *Plast Reconstr Surg.* 133(2): 142e-53e, 2014.

- 18 Jang BJ, Byeon YE, Lim JH, Ryu HH, Kim WH, Koyama Y, Kikuchi M, Kang KS, Kweon OK. Implantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells mixed with beta-tricalcium phosphate enhances osteogenesis in bone defect model dogs. *J Vet Sci.* 9(4):387-93, 2008.
- 19 Lim JH, Byeon YE, Ryu HH, Jeong YH, Lee YW, Kim WH, Kang KS, Kweon OK. Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs. *J Vet Sci.* 8(3): 275-82, 2007.
- 20 Quimby JM, Webb TL, Habenicht LM, Dow SW. Safety and efficacy of intravenous infusion of allogeneic cryopreserved mesenchymal stem cells for treatment of chronic kidney disease in cats: results of three sequential pilot studies. *Stem Cell Res Ther.* 4(2): 48, 2013.

総説

- R1 久保雄昭、岡田邦彦. 獣医療における脂肪幹細胞の可能性～脂肪組織を利用した再生医療. *CAP* 258: 38-45, 2010.
- R2 Lopez MJ, Jarazo J. State of the Art: Stem cells in equine regenerative medicine. *Equine Vet J.* 47(2): 145-54, 2015.
- R3 Schneidera MR, Wolf E, Braun J, Kolb H-J, Adler H. Canine embryonic stem cells: State of the art. *Theriogenology.* 74(4): 492-7, 2010.
- R4 Halla V, Hinrichsb K, Lazzaric G, Bettsd DH, Hyttela P. Early embryonic development, assisted reproductive technologies, and pluripotent stem cell biology in domestic mammals. *Vet J.* 197(2): 128-42, 2013.
- R5 Koha S, Piedrahita JA. From “ES-like” cells to induced pluripotent stem cells: A historical perspective in domestic animals. *Theriogenology.* 81(1): 103-11, 2014.
- R6 Whitworth DJ, Banks TA. Stem cell therapies for treating osteoarthritis: Prescient or premature? *Vet J.* 202(3): 416-24, 2014.

3) 各国あるいは人用での既存のガイドライン

<国内>

	表題	日付等
生物由来原料基準	生物由来原料基準	平成 15 年厚労省告示第 210 号
	生物由来原料基準の一部を改正する件	平成 26 年 9 月 26 日 厚生労働省告示第 375 号
	生物由来原料基準の一部を改正する件について	平成 26 年 10 月 2 日 薬食発 1002 第 27 号 厚生労働省医薬食品局長通知
	生物由来原料基準の運用について	平成 26 年 10 月 2 日 薬食審査発 1002 第 1 号、薬食機参発 1002 第 5 号 厚生労働省医薬食品局審査管理課長、厚生労働省大臣官房参事官（医療機器・再生医療等製品審査管理担当）通知
品質・安全性	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確保について [別添 2 は廃止]	平成 12 年 12 月 26 日 医薬発第 1314 号
	再生医療等製品の製造販売承認申請に際し留意すべき事項について [「加工」の定義]	平成 26 年 8 月 12 日 薬食機参発 0812 第 5 号 厚生労働省大臣官房参事官（医療機器・再生医療等製品審査管理担当）通知
	ヒト（自己）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について	平成 20 年 2 月 8 日 薬食発第 0208003 号
	ヒト（自己）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に係る Q&A について	平成 20 年 3 月 12 日 事務連絡（厚労省医薬食品局審査管理課）
	ヒト（同種）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について	平成 20 年 9 月 12 日 薬食発第 0912006 号
	ヒト（同種）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に係る Q&A について	平成 20 年 10 月 3 日 事務連絡（厚労省医薬食品局審査管理課）

	ヒト（自己）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について	平成 24 年 9 月 7 日薬食発 0907 第 2 号
	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ついて	平成 24 年 9 月 7 日薬食発 0907 第 3 号
	ヒト（自己）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について	平成 24 年 9 月 7 日薬食発 0907 第 4 号
	ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について	平成 24 年 9 月 7 日薬食発 0907 第 5 号
	ヒト ES 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について	平成 24 年 9 月 7 日薬食発 0907 第 6 号
上記通知で参照	ードナーのゲノム・遺伝子解析を行う場合ー ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	平成 13 年 3 月 29 日 (平成 20 年 12 月 1 日一部改正)(文科省、厚労省、経産省)
	ーフィーダー細胞を使用する場合ー 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ついて	平成 14 年 7 月 9 日医政研発第 0709001 号
	「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について	平成 16 年 7 月 2 日医政研発第 0702001 号
	ー非細胞・組織成分と組み合わせる場合ー 医療機器の製造販売承認申請等に必要となる生物学的安全性評価の基本的考え方について	平成 24 年 3 月 1 日薬食機発 0301 第 20 号
	ー製造のいずれかの過程で細胞をバンク化する場合ー 生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品）製造用細胞基材の由来、調製及び特性解析について（ICH-Q5D）	平成 12 年 7 月 14 日 医薬審第 873 号
	次世代医療機器評価指標	次世代医療機器・再生医療等製品評価指標の公表について [同種 iPS（様）細胞由来網膜色素上皮細胞等]
	次世代医療機器評価指標の公表について[自己 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞等]	平成 25 年 5 月 29 日 薬食機発 0529 第 1 号
	次世代医療機器評価指標の公表について[歯周組織治療用細胞シート等]	平成 23 年 12 月 7 日 薬食機発 1207 第 1 号
	次世代医療機器評価指標の公表について[関節軟骨再生等]	平成 22 年 12 月 15 日 薬食機発 1215 第 1 号
	次世代医療機器評価指標の公表について[角膜内皮細胞シート等]	平成 22 年 5 月 28 日 薬食機発 0528 第 1 号
	次世代医療機器評価指標の公表について[重症心不全細胞治療用細胞シート、角膜上皮細胞シート等]	平成 22 年 1 月 18 日 薬食機発 0118 第 1 号

ICH ガイドライン	ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価について (ICH-Q5A)	平成 12 年 2 月 22 日 医薬審第 329 号
	組換え DNA 技術を応用したタンパク質生産に用いる細胞中の遺伝子発現構成体の分析について (ICH-Q5B)	平成 10 年 1 月 6 日 医薬審第 3 号
	生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) 製造用細胞基材の由来、調製及び特性解析について (ICH-Q5D)	平成 12 年 7 月 14 日 医薬審第 873 号
	生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) 製造工程変更に伴う同等性/同質性評価について (ICH-Q5E)	平成 17 年 4 月 26 日 薬食審査発第 0426001 号
PMDA 科学委員会	iPS 細胞等をもとに製造される細胞組織加工製品の造腫瘍性に関する議論のまとめ	平成 25 年 8 月 20 日
PMDA 公表資料	無菌試験及びマイコプラズマ否定試験の考え方について	平成 26 年 1 月 17 日
研究に関する指針	ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針	平成 25 年厚労省告示第 317 号

<海外>

	表題	
米国 FDA (動物薬)	NEW ANIMAL DRUG APPLICATIONS * 現在動物用再生医療製品に特化した規制はなく、新薬と同じ扱い。	CFR Title 21 Part 514
米国 FDA (人体薬)	HUMAN CELLS, TISSUES, AND CELLULAR AND TISSUE-BASED PRODUCTS (HCT/Ps : ヒト細胞、組織または細胞・組織由来製品)	CFR Title 21 Part 1271
	CURRENT GOOD MANUFACTURING PRACTICE IN MANUFACTURING, PROCESSING, PACKING, OR HOLDING OF DRUGS; GENERAL	CFR Title 21 Part 210
	CURRENT GOOD MANUFACTURING PRACTICE FOR FINISHED PHARMACEUTICALS	CFR Title 21 Part 211
	Regulation of biological products	USC Subchapter II—General Powers and Duties, Part F—Licensing of Biological Products and Clinical Laboratories, subpart 1—biological products, § 262 (PHS Act Section 351)

	Regulations to control communicable diseases	USC Subchapter II—General Powers and Duties, Part G—Quarantine and Inspection, § 264 (PHS Act Section 361)
	HUMAN SOMATIC CELL THERAPY AND GENE THERAPY PRODUCTS	PHS Act Section 351 and/or FD&C Act
	PHS GUIDELINE ON INFECTIOUS DISEASE ISSUES IN XENOTRANSPLANTATION	OMB Control No. 0910-0456
EU	EMA ガイドライン *体細胞治療医薬品、遺伝子治療医薬品または組織工学製品は先端医療医薬品（ATMPs：Advanced Therapy Medicinal Products）としての扱い。	Regulation (EC) No 1394/2007

<実際の研究・製造施設のハード要件 研究・製造施設での運用ソフト>

	表題	日付等
薬機法関係	再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令 [GCTP 省令]	平成 26 年 8 月 6 日厚生労働省令第 93 号
	再生医療等製品に係る「薬局等構造設備規則」、「再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令」及び「医薬品、医薬部外品、化粧品及び再生医療等製品の品質管理の基準に関する省令」について	平成 26 年 8 月 12 日薬食発 0812 第 11 号医薬食品局長通知
	再生医療等製品に係る「薬局等構造設備規則」、「再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令」及び「医薬品、医薬部外品、化粧品及び再生医療等製品の品質管理の基準に関する省令」の取扱いについて	平成 26 年 10 月 9 日薬食監麻発 1009 第 1 号厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知
	ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の製造管理・品質管理の考え方について	平成 20 年 3 月 27 日薬食監麻発第 0327025 号
	無菌操作法による無菌医薬品の製造に関する指針	平成 23 年 4 月 20 日事務連絡（厚労省医薬食品局監視指導・麻薬対策課）
	治験薬の製造管理、品質管理等に関する基準（治験薬 GMP）について	平成 20 年 7 月 9 日薬食発第 0709002 号

再生医療等 安全性確保 法関連	再生医療等の安全性の確保に関する法律	平成 25 年法律第 85 号
	再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行規則 [再生医療等提供基準等]	厚生労働省令第 110 号
	医療機関における自家細胞・組織を用いた再生・細胞医療の実施について	平成 22 年 3 月 30 日医政発 0330 第 2 号
学会関係	細胞調製に関する施設及び運用に対する考え方	平成 25 年 9 月 3 日 日本再生医療学会
	免疫細胞療法 細胞培養ガイドライン	平成 25 年 11 月 12 日 日本免疫学会 日本がん免疫学会 日本バイオセラピー学会 癌免疫外科研究会 血液疾患免疫療法研究会 日本免疫治療学研究会

参考

PMDA (<http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/saisei-iryuu.html> 再生医療製品関連情報)
多能性幹細胞安全情報サイト (<http://www.nihs.go.jp/cgtp/cgtp/sec2/sispsc/html/regulation.html>)
平成 21 年度中小企業支援調査 (再生・細胞医療ビジネスの基盤整備に関する調査) 報告書

4) 研究・製造施設のソフト・ハード要件

①製造施設および作業者の要件

*細胞加工の工程管理や品質管理を適切に実施できる設備要件を満たした細胞加工施設（CPC）

*GMP または GMP 準拠

*汚染拡大防止対策を付設し、全行程を逸脱なく日本薬局方に定められた無菌操作環境が維持管理できること

*具体的には、清浄度ゾーニングによる無菌管理区域と間接支援区域の区分管理と適切な更衣管理、そのために必要な差圧管理、風向管理、換気回数、など。

*作業者がスムーズに動きやすい動線を考慮

*適切に運用するための衛生管理（環境維持）、施設管理（バリデーション）、作業者の教育訓練、これらについての手順や規則を明記した文書及び記録を通じた適切な管理

*作業者は、培養技術に関連する訓練、および施設利用に係る教育訓練を受け、適切に実施できること

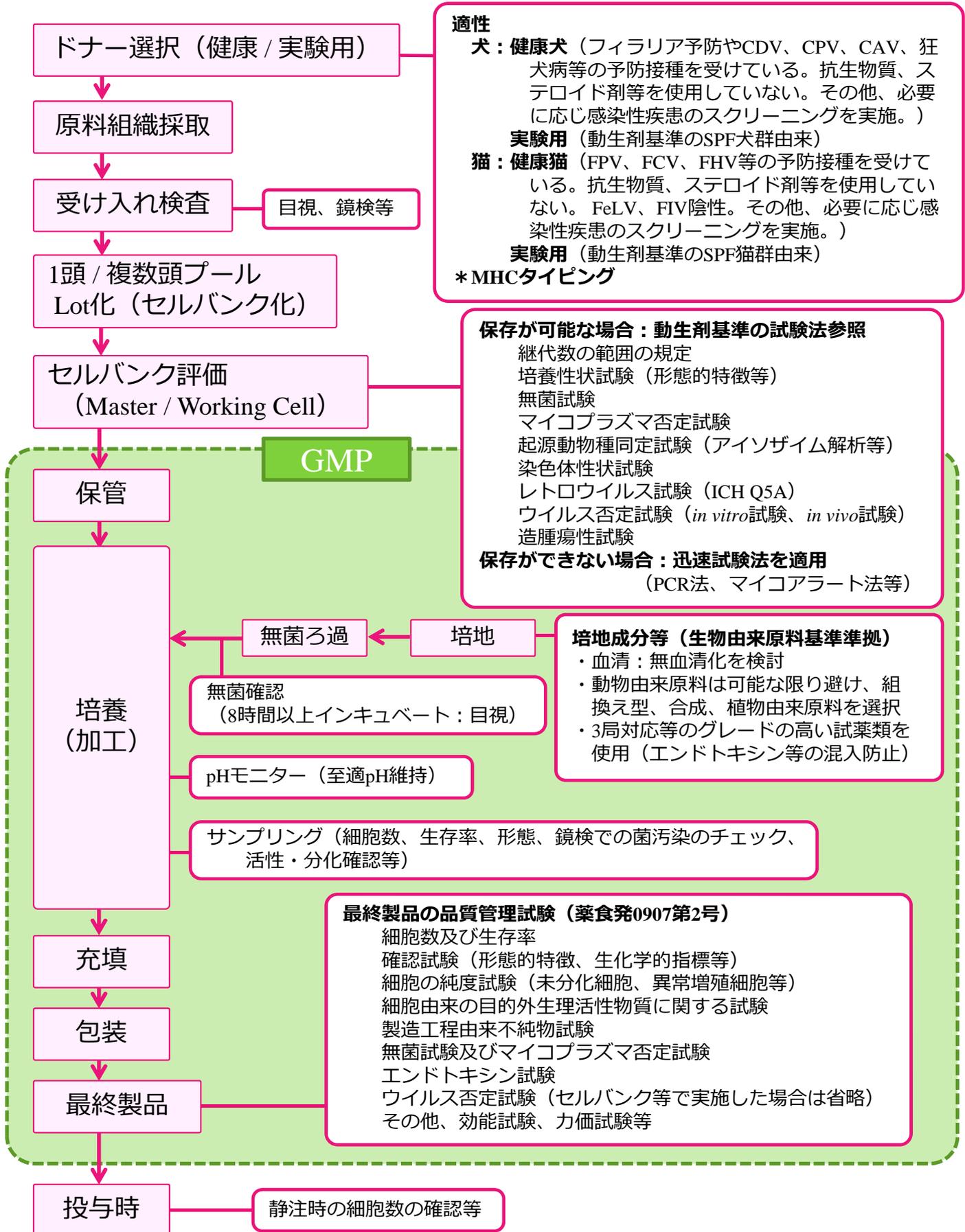
②研究用施設の要件

*研究施設のハード要件は、その研究レベルによって異なる

*可能な限り製造施設に準拠した施設設備を整備する

*作業者は、無菌技術を理解し実施でき、さらに CPC として施設運用を理解し運用できる者

動物用再生医療等製品の製造工程（案）



1. ドナー選択

- ・ビーグル犬を使用
- ・実験猫or 脂肪供与猫？
- ・実験用動物として (株)オリエンタル 酵母等から納入(ビーグル)
- ・2-3頭を飼育管理
- ・飼育管理場所 動物病院犬舎
- ・飼育の管理ログ
- ・ドナー年齢

- ・ウイルス感染チェック？
- ・MHCタイピング？

2. 採取

- ・動物病院 or J-ARM培養施設
- ・獣医師により 皮下脂肪を採取 (腹部・鼠蹊部等)
- ・採取量 0.5g~2g
- ・採取部位のログ
- ・採取量のログ

3. 培養-1

- ・J-ARM培養施設
- 前培養(1week)
 - ・サブコンフルエントで継代(P0)
 - ・FBS
 - ・コラゲナーゼ(recombinant)
 - ・培地(マイコプラズマ, 細菌・酵母フリー Grade)
- ・培養容器 培養バッグ・フラスコ ピペット等 **γ滅菌**
- ・培養管理ログ

- ・マイコ・細菌・酵母試験
- ・培養細胞溶液に含まれるエンドトキシン検査
- ・無限増殖能の否定？

1

4. 培養-2

本培養(1week)

- ・前培養に準ずる。
- ・対数増殖期前期を回収(P1)
- ・培養管理ログ
- ・FACSによる性状解析
- ・FACSデータ管理

5. 凍結保存

- ・クライオチューブ1本あたり 1×10^6 細胞
- ・凍結Buffer、緩速凍結器の使用 -30°C→-80°C→-196°C
- ・液体窒素下での凍結保存
- ・細胞保存ログ

6. 製品化・出荷

- ・病院からの発注 → 急速解凍
- ・細胞生存率の算出 トリパンプルー染色法
- ・クライオチューブ シリンジでの製品化
- ・ヤマト運輸等による冷蔵(4°C)運送
- ・製品化ログ
- ・出荷ログ

- ・マイコ・細菌・酵母検査
- ・培養細胞溶液に含まれるエンドトキシン検査
- ・FBSに含まれるアレルギー性物質(シアル酸濃度)
- ・無限増殖能の否定？

- ・出荷前試験: 細菌・酵母試験、エンドトキシン検査

2

7. 投与

- ・動物病院内で実施。
- ・送付した細胞は、静脈点滴(IV)あるいは局所投与で投与を行う。
- ・IVの場合は、肺塞栓のリスクを回避するため、投与細胞数の上限を 1×10^6 個/kgとする※。
- ・投与後のデータを病院から提出、管理

※Tatsumi et al. (2013) *BBRC* 431:203-209.
 Quimby et al. (2013) *Stem Cell Res. Ther.* 4: 48-59.

2～24時間の細胞輸送(保存)において4℃が生存率が一番高くなるデータあり(93%～70%)しかし時間とともに生存率が下がる。
 2時間以内は常温、ないしは37℃。それ以上は4℃保存。
 48時間以上かかる、沖縄、北海道エリアの輸送は、凍結のまま?

3

参考データ:

培養

- ・皮下脂肪0.5g・・・最終収量 ca. 1×10^7 細胞 → 凍結チューブ×10本 (1×10^6 /チューブ)
- 5g・・・〃 ca. 1×10^8 細胞 → 凍結チューブ×100本

安全性管理

- ・マイコプラズマ検出キット(MycoAlert™ RONZA社) 100キット ¥120,000(¥1,200/検体)
ルシフェリン反応による蛍光検出 ルミノメーター必要 ヘキスト染色法、直接培養法、RT-PCR法、マイコアラート
- ・細菌検査(大腸菌群、緑膿菌、サルモネラ、黄色ブドウ球菌他) ¥1,000/検体
- ・エンドキシン検査(0.25EU/mL未満) ¥5,000/検体 (リムルス試験 エンドセーフ)
- ・FIV検査 ……可能? 検査会社?
- ・無限増殖能の否定・・・ c-mycの発現の有無? DNA変異 FISH法染色体異常解析

倫理管理

- ・実験動物のためsacrificeも可能だが、皮下脂肪採取のみの処置なので、里親を募集することも可能か(製薬企業の例あり)

4

6) ヒト再生医療等製品に関する情報：自己軟骨細胞製品

製品名	ドナー選択	サンプリング	培養	製品化	出荷	投与
Carticel™ Genzyme Tissue Repair (1997/8/22) 	<ul style="list-style-type: none"> 自己 ウイルス感染症除外 	<ul style="list-style-type: none"> 関節鏡での軟骨採取 輸送キット 	<ul style="list-style-type: none"> 酵素で分解 細胞培養フラスコ(37°C)後、凍結保存 培養継続(12百万個～48百万個) 細菌・真菌検査 マイコプラズマ検査(定期) 形態学的検査 	<ul style="list-style-type: none"> 製造室の層流生物学安全キャビネット内製品化 培養細胞をトリプシン処理 ガラス製容器に充填し、ゴム栓 最終製品での出荷検査 	<ul style="list-style-type: none"> 最終製品での出荷検査 ロット集荷(無菌性試験：72時間培養；エンドトキシン：LAL；生存率：トリパンブルー染色；形態観察：顕鏡；一般安全性試験：トリパンブルー、検鏡、細胞毒性として溶出分析) 	<ul style="list-style-type: none"> 製造後72時間以内に使用 無菌性試験結果(14日間培養)は、投与時判明していない(予備試験結果、2日間培養陰性で出荷)
ChondroCelect® Tigenix NV (2009/10/5) 	<ul style="list-style-type: none"> 自己 HIV-1、HIV-2、HCV、HBV、梅毒検査の陰性 	<ul style="list-style-type: none"> 関節鏡で軟骨採取 検体調達キット(ロット番号：患者イニシヤル・病院での患者番号)：輸送の温度管理 ドナーの感染症検査結果でるまで検疫 	<ul style="list-style-type: none"> 検体の消化(外観検査後に、細砕・分離・洗浄して培養フラスコ) 拡大培養 細胞回収(生存はグラム染色で確認) 	<ul style="list-style-type: none"> 工程内検査(培養液外観、pH、微生物学検査、細胞形態、純度、細胞生存率、細胞回収率) 工程バリデーション：機能検査(細胞培養：3D細胞培養法；動物モデルでの <i>in vitro</i> 評価；遺伝子表現パターン) 製造工程バリデーション：バリエータの受容基準 1万個細胞/μL+グルコース加MEM GMP準拠 	<ul style="list-style-type: none"> コラゲナーゼ、ウシ胎児血清、ブタトリプシン含有(EDQM認定品)：TSE除外品 無菌性、マイコプラズマ、エンドトキシン(欧州局法)、グラム染色 細胞数、生存率確認 外観検査、バイアル完全性評価 品目仕様 製品安定性(48時間) 	<ul style="list-style-type: none"> 関節解放手術、ChondroCelectを腓骨内側の骨膜で縫合して、ファイブリン糊で密閉 コラーゲン膜での臨床データなし(市販臨床試験)
JACC (ジャック®) (株) ジャックパン・ティッシュ・エンジニアリング (2012/7/27) 	<ul style="list-style-type: none"> 自己 ドナースクリーニング未実施 	<ul style="list-style-type: none"> 担当医師採取 組織運搬チューブ・断熱輸送容器 	<ul style="list-style-type: none"> 検体消化、培養、アテロコラーゲンとの培養 形態観察、形態保持確認、外観 アロコラーゲン(ウシ) 	<ul style="list-style-type: none"> アテロコラーゲン、ウシ胎児血清、ブタトリプシン、アムホテリシリンB、デスオキシコルチコナ 出荷試験：生菌数確認、マイコプラズマ否定、生細胞密度確認、生細胞率、生細胞濃度、BSA残量、エンドトキシン 製品安定性(80時間) 	<ul style="list-style-type: none"> アテロコラーゲン、ウシ胎児血清、ブタトリプシン、アムホテリシリンB、デスオキシコルチコナ 生菌数確認、マイコプラズマ否定、生細胞密度確認、生細胞率、生細胞濃度、BSA残量、エンドトキシン 製品安定性(80時間) 	<ul style="list-style-type: none"> 十分な知識・経験を有する医師・施設で使用
MACI® Genzyme Europe BV (2013/6/27) 	<ul style="list-style-type: none"> 自己 HIV-1HIV-2、HBV、HCV、梅毒の陰性(輸送キットの血液) 	<ul style="list-style-type: none"> 関節鏡で検体採取 軟骨検体輸送キット(検体+血液サンプル)：2°C～37°Cで3日間維持 	<ul style="list-style-type: none"> 外観、色、サイズ、pH、変性温度、重量、エンドトキシン、無菌性 50万～100万個/cm²+コラーゲンI/III型膜(14.5cm²) 	<ul style="list-style-type: none"> 同定(軟骨細胞のマーカー、HAPLNIと滑膜マーカーのMFAPSをRTPCRで検出) 効力(Aggregan mRNAをリアルタイムPCR測定) 外観、生存、最低細胞数、同定、効力、無菌性、エンドトキシン、マイコプラズマ 製品安定性(6日間) 	<ul style="list-style-type: none"> MCI治療教育プログラムを修了外科医のみ 	

7) 再生医療等製品に関連する国際規格

1. はじめに

再生医療製品に関する国際規格が存在します。

“ISO 13022:2012, Medical products containing viable human cells – Application of risk management and requirements for processing practices”

2. 経緯

本国際規格は、医療機器の生物学的安全性評価（現在は生物学的・臨床的評価に改名）を担当する ISO TC194 のサブグループ 1（Subcommittee SC1）が作成したものです。医療機器には組み合わせ医療機器（Combination medical device）があり、ヒトや動物の細胞等を組み合わせものが存在しますので、本規格を作成したと聞いております。

3. 目次

まえがき

序論

1. 適用範囲

2. 引用規格

3. 用語及び定義

4. リスク管理プロセス

4.1 一般的事項

4.2 細胞構成物に関連したハザード

4.3 リスク分析

4.4 リスク評価

4.5 リスクコントロール

4.6 総合的残留リスク受容の評価

4.7 製造と製造後の情報提供システム

附属書 A（参考）ISO13022 適用に関するガイドライン

附属書 B（参考）細胞由来医療製品のリスク管理プロセスの図解

附属書 C（規定）ドナー選定及び試験法の要求事項

附属書 D（参考）組織調達のガイドライン

附属書 E（規定）製造中細胞及び組織の取扱いに関する要求事項

附属書 F（規定）包装及び表示類の要求事項

附属書 G（参考）輸送のガイドライン

附属書 H（参考）貯蔵のガイドライン

附属書 I (規定) トレーサビリティーの要求事項
附属書 J (規定) ウィルス及び TSE のような感染源混入に関連するリスク低減措置
附属書 K (参考) 医療製品の製造に用いるヒト細胞・組織の造腫瘍性疑いに起因するハザードに関連するガイダンス
附属書 L (参考) 微生物学的細菌混入に関連するガイダンス
附属書 M (参考) 医療製品の非細胞構成の有害事象疑いに関連するガイダンス
附属書 N (規定) 医療製品の細胞構成物の有害事象疑いに関連するガイダンス
附属書 O (参考) 医療製品の細胞構成物の特性評価に関するガイダンス
附属書 P (参考) 臨床評価及び検査方法
参考文献：62 文献

8) 再生医療等製品に関するシンポジウムでのアンケート調査結果

アンケート回答者

シンポジウム参加者の約40%から回答を得た。この内、動物用ワクチン・バイオ医薬品研究会会員が約35%、再生医療関係3学会所属者が約26%、獣医クリニック等からの参加者の回答は約13%だった。回答者の65%が何らかの意見を記述されたが、獣医クリニック関係の方からの主だった意見の記述はなかった。本事業推進にあたり、再生獣医療のステークホルダーである臨床獣医師の意識、意見をより良く知る必要があれば、別途アンケートを企画したい。

動物の再生医療に対する意見

- ・ 治療費・価格が高額にならないことが普及への要件
- ・ 患者の納得が得られるものであること
- ・ 過度の期待や根拠のない療法の乱立を危惧する
- ・ 医学領域との共同、医学への貢献に期待
- ・ 対象動物を使用できるため基礎的研究がおろそかになりやすい

動物用再生医療等製品、製品開発に対する意見

- ・ 動物用再生医療等製品のニーズは高い
- ・ 症例数の少ない疾病に対しては製品化が難しいのではないかと
- ・ 安全性の確保（低リスク）が重要
- ・ リスク/ベネフィットの考慮も必要
- ・ 基礎研究－臨床応用研究の連携

評価方法などを検討する際の留意事項

- ・ 対象症例の選択、治療法等の妥当性
- ・ 対象動物と同種の動物を用いた安全性の評価
- ・ 毒性、病原体、腫瘍細胞、操作時混入する可能性のある病原体等のチェック
- ・ 対象動物に対する有害事象の想定とそれに対する安全性評価（過度の規制をしない）
- ・ 実用化までの時間の短縮（必要最低限の安全性等の基準作成）
- ・ 安価、短時間に実施できる試験法の開発（承認を得やすくする）
- ・ ドナー選択、製品安定性、保存性
- ・ 効果の科学的証明

必要な制度・技術開発、解決すべき課題

- ・ ロット形成が可能な製品の開発
- ・ 科学的根拠のある統一した基準作り

- 異なる専門分野・機関による安全性評価
- Emerging Virus の徹底的な排除
- ユーザーの獣医師や飼い主等への積極的情報（予後、有害事象等）提供
- GMP 体制を動物病院で実施するための仕組み作り
- control-study の義務づけ
- 細胞単離に使用するモノクローナル抗体等のツールの作成

動物用ワクチン—バイオ医薬品研究会 2014 年秋 シンポジウム

「再生獣医療法の展望—新技術がもたらす可能性と課題—」アンケート調査結果

シンポジウム参加者数 78 名 アンケート回答数 31 名

問1 下記研究会、学会の会員ですか。

動物用ワクチン—バイオ医薬品研究会	11 名
日本獣医再生・細胞療法学会	3 名
日本再生医療学会	5 名
日本獣医再生医療学会	5 名
非会員	12 名

問2 所属先に該当するところを○で囲んでください。

大学等研究機関	10 名
試験研究機関	1 名
民間企業	10 名
獣医科クリニック等	4 名
行政	5 名
その他	1 名

問3 職種について該当するところを○で囲んでください。

研究	20 名
獣医師・獣医療関係	12 名
管理・運営	5 名
学術・営業	1 名
その他	4 名

問4 動物の再生医療に対する期待、希望、危惧などについてお聞かせください。

4a 動物の再生医療に対して、該当するところを○で囲んでください。

期待がある	22 名
希望がある	13 名
危惧がある	2 名

4b ご意見等をお書きください。

【回答】

医学領域との交流、共同研究による相互の発展に期待したい。

動物、ヒト両方ともオーダーメイド的カスタム医療としてスタートラインにある。

動物の方が規制がゆるい点、ヒト医療をリードする可能性を秘めている。

根拠のない療法の乱立

ヒトの基礎実験としての重要性から動物再生医療研究は必要

世の中に出るものである以上、とにかく安全性だけはしっかり確保してほしい（できるだけ低リスク）。でも疾病の種類やステージによっては、多少のリスクはあってもベネフィットが大きい場合もあると考えられる。使用目的によるリスク/ベネフィットをしっかりと考慮した規制にしてほしい。

あたかも画期的な治療のように扱われており、現状と異なる。

患者の納得が一番重要です。

危惧もあるが、将来性は十分にある。信頼性と費用が要因として重要。

治療費が高額にならない定額で再生医療が受けられれば良いと思う。

問5 動物用再生医療等製品に対するニーズ、実用化への期待、要望、問題点等をお聞かせください。

5a 動物の再生医療製品について、該当するところを○で囲んでください。

ニーズ、実用化への期待がある	22名
要望がある	5名
問題点がある	4名
その他	1名

5b ご意見等をお書きください。

【回答】

マスプロダクショナルな製品に対するニーズは低いのではないかと。

ニーズ、実用化の必要性はあると思います。どのような疾病に使用する再生医療等製品になるのかによりますと思いますが、症例数が少ない場合、製品化まで結びつくのか、またコスト、販売額が問題となるのではないのでしょうか。

治療、製品利用にかけられるコストにどうしても限界がでると思うので、安価に供給できる体制作りも必要になるかと思う。

コスト面での改善化による広い普及を望みます。

ニーズは高いことを現場で感じている。一方として実験動物で得られる理想的な結果は得られない。

値段の問題さえ解決できれば、ニーズは大いにあると考える。

医学に通じるような方向になると良いと思う。できるだけ、研究段階から実用化までのタイムラグが少ないと良いと思う。（最低限の安全性確保ができれば、市場に出せるようにする）問題点としては、どこまでを最低限の安全性とするか、しっかり決めておかなければならないことだと思う。

認可までの時間と、価格の高さが懸念の材料だと思います。

「製品」というためには一定の基準を作らなければならない。
ニーズの大きさが実用化へ最も重要

問6 再生獣医療等製品を実用化するためには安全性試験など種々の評価を行う必要があります。評価方法などを検討する際、留意すべきことについて、ご意見をお聞かせください。

【回答】

対象動物を（ヒトと異なり）用いることができる分、基礎的な研究がおろそかになりやすい（倫理面で疑問がある）。

評価方法の明確化、標準化が必要である。

個別医療としての性質から提供（供給）システムとしての安全性担保が必要である。

毒性、感染、腫瘍形成能のチェック

安価で短時間にできる試験にすべき

ヒトに準じた安全性基準は必要、動物で安全でなければヒトへの応用は無理、とくに腫瘍が起こるかどうか、???ことが必要

リスクとベネフィットをしっかりと考える必要がある。

対象の動物に対して、どのような有害な事象が起こりうるのか、しっかり検討した上で、想定している有害な事象が起こらないことを評価すべき（あまり、何でもかんでも危険だとして規制すべきでないと思う）。体内に入れるものなので、感染症など（腫瘍も含む）が混入しないようコントロールすべき。

再生医療のうち、ヒト用製品を動物の体内で製造する場合、未知の感染症の原因菌、原因ウイルスのチェックをどうするのか、どうスクリーニングするのか、重要なポイントと考えます。

ドナー選択、製品安定性、保存性

少なくとも、メジャーな病原体や操作中に混入する可能性のあるもののチェック

長期的な視野で評価していただきたい。

製品と同種の動物を用いて安全性の評価を行う必要

いろいろありすぎる

対象症例の選択、治療法等の妥当性が最も重要

問7 再生獣医療が広く普及するためには、安全性が確保された再生医療等製品の供給体制の確立が必要です。これを実現するためにはどのような制度や技術開発が必要と考えますか。また、解決すべき課題としてどんなことが考えられますか。ご自由にお書きください。

【回答】

有効期間（細胞の保管等）

GMP 体制を動物病院で実施できるための仕組み作り

安価で短期間にできる試験法の開発 製品として承認しやすくなる体制がほしい
基礎研究－臨床応用研究の連携。control-study を徹底（義務づける）する必要あり
実用化に向けてのコストダウンと社会の認知

ユーザー（vet）やオーナー（飼い主）等に対する情報提供を行う。なるべく積極的に情報を出す（予後について、有害事象の有無など）。大きなデータバンクのようなイメージも有りかも。

Emerging Virus の徹底的な追放が必須

異なる専門分野（機関）による安全性評価を実施する。

統一した基準が必要。それを支える科学的確証をとることが必要。細胞を単離するためのマーカーに対するモノクローナル抗体の作製。

ロット形成が可能な製品の開発が必要。

むずかしい問題ですね。

すばらしい、希望を感じた。

Allograft でも十分な効果の得られることを科学的に証明すること。

9) 再生医療等製品に関するシンポジウムでの講演プロシーディング

【I. 基調講演】

日本の獣医再生医療の将来と問題点

日本再生・細胞療法学会
国立大学法人東京大学 名誉教授
佐々木 伸雄

日本の再生医療は、ES 細胞、次いで iPS 細胞の発見によって大きく進展した。iPS 細胞による網膜の加齢黄斑変性症については、臨床試験がすでに始まっている。また、各臓器細胞に分化させた iPS 細胞は創薬分野での活用が広く行われつつある。

一方、様々な組織には幹細胞があることが知られており、組織損傷時の組織再生に大きな役割を果たしていると考えられていた。しかしこれらに多能分化能があることが解明され、再生医療の道が格段に広がった。最近では骨髄、臍帯血ならびに脂肪組織由来の幹細胞を用いる再生医療が広く注目を集め、中枢神経系、心筋、軟骨、腱・靭帯、血管などの組織再生、あるいは糖尿病や肝不全に対する膵島や肝細胞移植に用いる細胞作製への応用臨床応用が開始されている。また、これらの幹細胞を特定の細胞に分化させ、それをシート状に再生して移植する技術が、心筋、軟骨、食道、歯周組織などで試みられている。

私個人はこれらの幹細胞等を用いる研究は行っておらず、決してこの分野に詳しい訳ではなく、このシンポジウムで総括的な話をする能力はない。多少の経験は、BMP（骨形成性蛋白）-2 とバイオマテリアルを用いた大きな骨欠損に対する骨再生、あるいはインクジェットプリンターを用いて大きな骨欠損部と同じ形態をした骨を作製し、移植する、といった、いわゆるバイオマテリアル分野での研究である。これらはいずれも医学部ないし製薬メーカーとの共同研究であり、一定の成果をあげたが、これらに参画した最大の理由は、このような治療法は、将来安価になれば必ず獣医学領域に普及する、との信念からであった。

日本の獣医領域における再生医療

最近の人医学領域の幹細胞を用いた再生医療の進展は、目覚ましいものがある。それらを応用した獣医学領域の再生医療も多くの注目を集め、実用化に向けた試みが広く行われるようになった。現在のところ、いずれも治療試験・研究のレベルではあるが、骨髄間葉系細胞を用いた犬の脊髄再生、馬の腱再生、軟骨再生、また、実験室レベルではあるが、肝細胞や血液細胞への分化・応用が試みられている。最近では、脂肪由来の幹細胞を含む間質細胞が同様に脊髄再生などに応用され始めている。

それらの中で、倉敷芸術科学大学の田村先生らが行っている研究は将来性の高いものと思われる。すなわち、きわめて予後の悪いグレード 5 の椎間板疾患に対する骨髄の幹細胞を含む単核球の局所投与であり、従来単純な半側椎弓切除術単独の成績に比較し、きわめて予後成績が良いこと、しかもさらにステロイドの大量投与等、その他の治療法と prospective に比較した試験においてもその有用性が有意に証明されている。この研究はきちんと対照群において統計的な解析を行っている点が高く評価出来る。

同様に、日本中央競馬会競走馬総合研究所の笠嶋先生が行った、骨髄由来の幹細胞を浅屈腱断裂部に直接投与した研究においては、組織学的所見および超音波検査上は非移植群と移植群に大きな差がなく、また、その後の競争成績も必ずしも明確に有意な向上を示さなかったことを示しており、現状では、幹細胞移植の効果を確認できなかった、とするものである。この研究もきちんとした対照群をおき、科学的に評価を加えたものであった。

獣医学領域における再生医療の課題

現在のところ、獣医臨床領域で再生医療の明確な効果を示したものは必ずしも多くはなく、多くの課題が残されている。そのひとつは、どのような分化段階で幹細胞を移植すべきか、あるいは田村先生の研究のように、必ずしも分化させずに幹細胞を含む単核球集団として移植しても大きな効果が得られるのではないかと、考える考え方もある。獣医学領域としては、手順が簡素であることから、必要な施設費等のコスト負担が少ない移植法がより実際的ではないかと考えられる。

さらには、多くのサイトカイン、増殖因子等が含まれる幹細胞等の培養液のみを投与しても効果があるのではないかと、する報告もなされており、今後の研究の成果が期待される。もしそれらが証明されるようであれば、必ずしも自家細胞移植にこだわる必要はなく、同種幹細胞等を再生医療に用いる、あるいはその培養液の投与という選択肢も出てくるかもしれない。

一方、移植する細胞数はどの程度が好ましいか、という点もまだ手探りの段階にある。移植された細胞が組織修復にどのように作用しているか、局所に投与された細胞の消長はどうか、といった点もまだ十分には把握されておらず、これも今後の課題と思われる。これらの課題解決には組織再生の機序の解明が必須であり、前述した幹細胞そのものが必要であるのか、あるいはそこから放出される様々なサイトカインや増殖因子の作用がもっとも重要なのか、さらには両者がともに必須なのか、といった点の解明が待たれる。

また、今後日本の獣医療に再生医療が広く応用されるためには、どのような症例が再生医療の対象となるか、投与される細胞の質や数などをきちんと検討する必要がある。さらに、その安全性やリスク、予後の可能性など、詳しい内容をきちんと説明して飼い主の理解を得ることも重要である。最終的な結果についても科学的に分析し、それを社会に報告することも再生医療の進展に必須と思われる。

獣医再生医療の将来

獣医学の基本は比較動物学であり、多くの動物種に人と共通する疾病がある。これらの病態はしばしば動物種を越えて共通しており、人の再生医療の適応となる疾患が動物にも存在することは多い。

従来、再生医療の研究は、多くの疾患モデル動物を用いてその効果が検討されてきた。その場合、モデル動物における成績は良好であったが、実際の症例に応用した場合、必ずしも予想した成績が得られない、といったことも多い。これは再生医療に限らず、モデル動物の限界を示すものであり、実際の症例における効果をより正確に把握する方法が求められている。

その意味で、人における再生治療効果を判定するために非常に大きな役割を果たすと期待されるのが、動物の症例である。もちろんそのような再生治療は直接動物へ応用さ

れ得る。しかし、再生医療には高額な資金が必要であり、また研究に必要な施設、技術的ノウハウなどから、獣医学領域における再生医療の研究は不十分な状況にある。

それぞれの分野の問題点を解決するひとつの策は、医学の再生医療分野と獣医学が広く連携することであろう。そのためには、両者が連携して行う研究を増やし、より多くの結果を情報発信することである。我々獣医領域にはそれだけの資源があり、また、興味を持つ臨床家、研究者が数多く存在する。この連携がさらに進展することを期待している。

平成 25 年 11 月 27 日に、「薬事法等の一部を改正する法律」¹が公布された。本改正の趣旨は、「医薬品、医療機器、再生医療等製品等の安全かつ迅速な提供の確保等を図るため、最新の知見に基づく内容が記載された添付文書の届出義務の創設等の安全対策の強化を行うとともに、医療機器の登録認証機関による認証範囲の拡大、再生医療等製品の条件及び期限付承認制度の創設等の医療機器及び再生医療等製品の特性を踏まえた規制を構築する等の措置を講ずること。」²とされており、ここからも再生医療等製品が本改正における大きなトピックであることが理解できる。法律名はシンプルな「薬事法」から、本法の意義を体現した「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」（以下「薬機等法」とする。）に改められた。

再生医療等製品には、人又は動物の細胞に培養その他の加工を施したもの（以下「細胞加工製品」とする。）及び遺伝子治療用製品が含まれるが（薬機等法第 2 条第 9 項）、本項では前者について述べる。ここでいう「培養その他の加工」とは、疾患の治療や組織の修復又は再建を目的として、細胞の人為的な増殖・分化、細胞の株化、細胞の活性化等を目的とした薬剤処理、生物学的特性改変、非細胞成分との組み合わせ又は遺伝子工学的改変等を施すことを指す³。細胞加工製品には、医療又は獣医療に使用され、身体の構造・機能の再建・修復・形成を目的とするもの又は疾病の治療・予防を目的とするものが含まれる。同製品の範囲は、薬事法等の一部を改正する法律の施行に伴う関係政令の整備等及び経過措置に関する政令⁴の第 1 条の 2 及び別表第 2 に規定されており、「ヒト細胞加工製品」及び「動物細胞加工製品」に大別される。動物細胞加工製品はさらに①動物体細胞加工製品（②及び④を除く。）、②動物体性幹細胞加工製品（④を除く。）、③動物胚性幹細胞加工製品、④動物人工多能性幹細胞加工製品の四種に分類される。翻って言えば、これらに分類されない未加工の細胞を成分とする製品は再生医療等製品とは見なされず、通常の医薬品としての扱いを受けることとなる。

改正の趣旨でも謳われている「安全かつ迅速な提供の確保」のため、薬機等法には必要な条件及び一定の期限付きで再生医療等製品の承認を行う制度が盛り込まれた（図 1）。これは、従来型

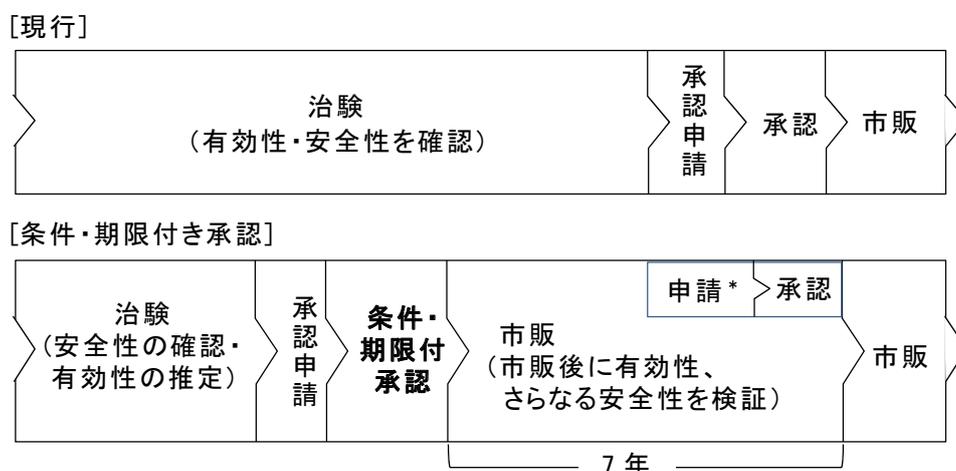


図 1 再生医療等製品の条件及び期限付承認

* 期限内に再度承認申請を行い承認されない場合は、条件及び期限付承認が失効する。

の医薬品等に比べ有効性評価が極めて困難である細胞加工製品の特性を踏まえた措置である。現行の承認制度においては、生細胞を有効成分とする製品であっても、治験において有効性と安全性の両者を確認することが求められる。これに対し条件及び期限付承認制度では、治験を含む各種試験で安全性が確認されており、かつ有効性が推定できれば、原則として7年を超えない範囲内の期限を切り、一定の条件付きで市販が可能となる(薬機等法第23条の26)。ヒト用製品における条件としては、専門的な設備を有する医療機関に販売を限定すること等が検討されている^V。動物用製品においても、製品の性質及び使用対象動物等に合わせた条件設定が必要となる。条件及び期限付承認を受けた者は、期限内に有効性等に関するデータを収集し、改めて承認申請を行う必要がある。

これまでの研究開発動向調査から、細胞加工製品は A) 血液・免疫細胞製品、B) 補充療法製品、C) サイトカイン療法用製品に大別されると考えられた。A) の例としては、iPS 細胞から作製する輸血用血液成分(血小板、赤血球等)がある^{VI}。また、有効性の推定も比較的容易であり、条件及び期限付きに承認制度になじみやすいと考えられる。免疫細胞の強化技術が、愛玩動物はもとより産業動物における疾病予防等にも応用され始めていることから^{VII}、免疫細胞製品の実用化と普及が期待される。B) は、皮膚や軟骨等の組織を細胞培養又はスキャフォールドの利用によりあらかじめ構築し、物理的な欠損を生じた患部等に補充するものだが、膨大な製造コストがかかるため獣医療分野での製品化は未知数である。C) は、馬の屈腱炎治療がよく知られており、犬の脊髄損傷及び重症肝疾患治療として複数の治験が進んでいる。しかし、細胞からのサイトカイン等の分泌は生体との相互作用により変化するものであるため、有効性の推定は比較的困難であると思われる。

何を持って「有効性が推定される」とするかについては、申請者が個別の製品毎に設定する必要がある。しかしながら、薬機等法の趣旨に則り迅速な供給を確保するためには、上記の製品のタイプ毎に基本的な考え方が整理されることが望ましい。これらは極めて学問的な事象であることから、アカデミアと業界そして規制当局の共同作業を通してなされるべきであり、そのためのプラットフォーム作りが鍵となる。ヒト用製品分野では、再生医療イノベーションフォーラム(FIRM; <http://firm.or.jp/>)が、培養や性能評価手法等の標準化をはじめとした、いわゆるプレ・コンペティティブな共通基盤の構築のための活動を開始している。幸い動物版 FIRM 結成の動きがあり、今後の活動が期待される。

一方、安全性確保の重要性は、従来の医薬品と同様である。しかしながら、生細胞を成分とする細胞加工製品は、化学物質/タンパク質製剤に比べその性質が変化しやすいこと及び細菌やウイルスと異なりクローニング操作ができないことから、不安定で不均一であることが避けられない。そのため、最終製品の検査において確実に安全性を担保するための確認事項を設定することは極めて困難である。そこで、製品の製造～供給スキームの各ステップにおいて安全性担保にかかる重要確認事項等を設定することが現実的な管理方法となる。図2に、動物用他家製品を例として、開発メーカー等からの聴きとり結果を一般化しフローチャートで示した。また、各ステップで想定される、安全性担保にかかる重要確認事項の例を欄外に斜字体で示した。これらをベースとして、ヒト用製品の既存指針等を参考としつつ、農林水産省の補助事業において、動物版の指針素案の取りまとめが進行中である。本事業も、産学官共同作業のプラットフォームとして機能していると言える。

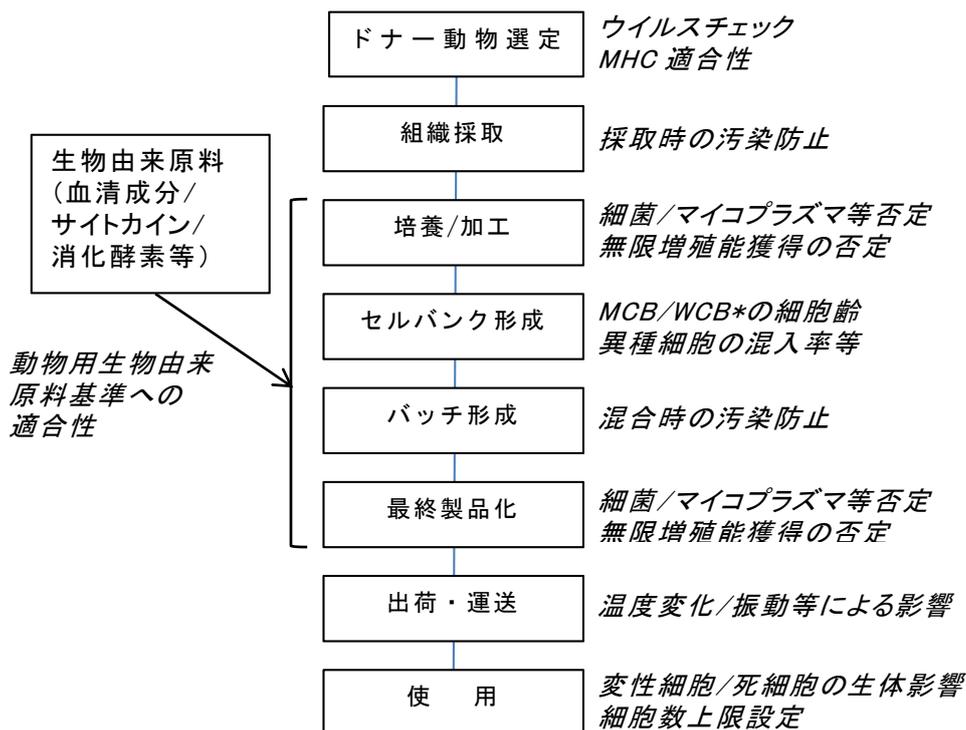


図2 細胞加工製品の一般的製造・供給スキームと重要確認事項例
*MCB: マスターセルバンク、WCB: ワーキングセルバンク

獣医療用の細胞加工製品は、人用製品に比べ先進的な試みを実施しやすいため、疾患治療モデルとしての有用性が世界的にも注目されている。我が国は、条件及び期限付承認制度をはじめとした、再生医療等製品の安全かつ迅速な提供を旨とした法整備が世界に先駆けて行われており、その恩恵は獣医療分野にも灌流している。また、動物版 FIRM や農林水産省補助事業等をプラットフォームとして製品開発の共通基盤が整備されつつある。平成 26 年11月の薬機等法の施行を迎え、産官学の取組を通したいっそうの開発推進が期待される。

- ⁱ 薬事法等の一部を改正する法律(平成 25 年法律第 84 号)、平成 25 年 11 月 27 日公布、
<http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11120000-Iyakushokuhinkyoku/0000045722.pdf>
- ⁱⁱ 薬事法等の一部を改正する法律案要綱、
<http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11120000-Iyakushokuhinkyoku/0000045718.pdf>
- ⁱⁱⁱ ヒト(同種)由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について (H20.9.12.薬食発第 0912006 号)
- ^{iv} 薬事法等の一部を改正する法律の施行に伴う関係政令の整備等及び経過措置に関する政令 (H26年政令第269号)
- ^v 野村由美子、薬事法改正等に関する総論～再生医療等製品について～、レギュラトリーサイエンス学会誌、Vol. 4, 215-221 (2014)
- ^{vi} Nishimura T, Hatoya S et al., Generation of functional platelets form canine induced pluripotent stem cells, Stem Cells Dev, 22, 2026-2035 (2013)
- ^{vii} 大塚、山口; 細胞免疫療法を応用した新しい細胞強化技術～産業動物のための疾病の予防～、月刊バイオインダストリー、Vol 31, 69-76 (2014)

【Ⅱ. iPS 細胞がもたらす可能性】

イヌ iPS 細胞由来の血小板の作出

公立大学法人大阪府立大学大学院
生命環境科学研究科 獣医学専攻
稲葉 俊夫

血小板減少症はイヌとヒトで共通の疾患であり、点状出血や鼻出血などを主徴として、血小板数の減少を生じる疾患である。本症は自己免疫疾患や血小板の機能異常などが原因で起こるが、近年では、医療の高度化により悪性腫瘍に対する抗がん剤や放射線治療において、骨髄の造血抑制による血小板減少症もしばしば問題となっている。本症の治療法として新鮮血小板の輸血があるが、ドナー確保の難しさ、ウイルス感染の危険性、血小板製剤の保存期間の短いことなどから、長期間を要する治療法としては問題があり、新たな治療法が求められている。

近年、幹細胞を用いた再生医療研究は日進月歩で進められている。幹細胞には成体幹細胞、胚性幹細胞 (ES 細胞)、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) などがあるが、この中でも iPS 細胞は自己複製能が高く、多分化能を有しており、自己の細胞から作製した場合には移植時の拒絶反応も起こらないことから注目されている。我々の研究室では、ヒトと共通の疾病を自然発症し、かつ医薬品開発における毒性評価の必須動物であるイヌに着眼し、iPS 細胞由来血小板を用いたイヌ血小板減少症の治療に向けて、未分化状態の高いイヌ iPS 細胞株の作製および血小板への分化誘導を試みており¹⁾、その概要を紹介する。

①イヌ iPS 細胞の作製

イヌ胎子線維芽細胞にレンチウイルスを用いてヒト由来の 4 つの多能性関連転写遺伝子 (*OCT3/4*、*SOX2*、*KLF4* および *C-MYC*) を導入し、その後、マウス胎子線維芽細胞を播種したディッシュ上で、霊長類 ES 細胞培養液にノックアウト血清代替物 (KSR) を加えて培養し、iPS 様細胞コロニーを得た。本コロニーはマウス iPS 細胞と同様の立体型を示し、25 継代以上まで維持できた。本細胞は、未分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ、*Nanog*、*TRA-1-60* および *SSEA4* 染色陽性を示し、RT-PCR で *NANOG*、*OCT3/4* および ES 細胞特異的な *REX1* 遺伝子の発現が確認された。さらに、浮遊培養により胚様体を形成し、その後の接着培養で三胚葉マーカーのいずれかの抗体に陽性を示し、これらの遺伝子を発現する細胞に分化することが確認された。長期継代後の染色体数は $2n = 78$ の正常 2 倍体で、性染色体は雄型を示した。

②イヌ iPS 細胞由来血小板の作製

上記の細胞を、造血サイトカインを分泌する OP9 細胞株を播種したディッシュ上で、ES 細胞分化培地に血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を加えた培地を用いて 14~15 日間培養した。その後、幹細胞因子、ヘパリンおよびトロンボポエチン添加培地に替えて再播種し、培地交換ごとに回収した上清中の細胞について、光学顕微鏡および電子顕微鏡による形態観察、巨核球および血小板マーカーに対する免疫染色およびフローサイトメトリー解析、さらに、フィブリノゲンとの結合能を調べた。その結果、ギムザ染色およびフローサイトメトリーによって成熟巨核球に分化することが確認された。また同時に、血小板マーカー陽性で、成犬血中の血小板と同様の大きさの粒子が観察され、電子顕微

鏡で血小板構造を有していることが確認された。この血小板様粒子はフィブリノゲンとの結合能を有していることがわかった。

上記のように、イヌ体細胞から 25 代以上継代可能であり、未分化状態の高い iPS 細胞を作製することができた。また、このイヌ iPS 細胞を成熟巨核球および機能的な血小板に分化誘導することができた。今後、産生効率の良い iPS 細胞株の選別、効率的な血小板誘導法など臨床応用する上で課題となる技術の開発が期待される（図 1）。

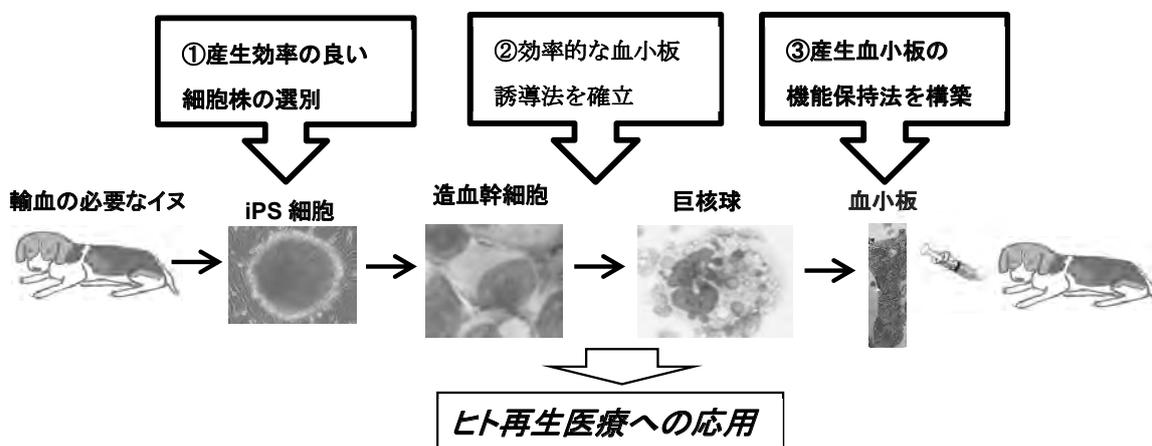


図 1 イヌ iPS 細胞由来の血小板作出の課題と展望

ごく最近、オーストラリアの研究グループはイヌ iPS 細胞から間葉系幹細胞（以下 MSC）への分化誘導に成功したことを報告した²⁾。彼らが研究している MSC の臨床応用について、2002 年頃から欧米で骨髄間質細胞由来の MSC がウマの骨関節疾患に対して使われ始めており、小動物臨床分野においても、2007 年頃から韓国で臍帯血あるいは脂肪由来の MSC が脊髄損傷に対して用いられ始めている。しかし、自家移植で得られる MSC は採取効率が低く、採取時のリスクや、ウイルス・微生物汚染、継代と共に細胞増殖能が急速に低下、均質な製品としてロット形成ができないなど検討を要する課題がある。iPS 細胞由来 MSC ではこれらの課題をクリアーし、さらに、比較臨床試験が実施可能で、安全性や有効性の検証が可能となる。自然発症の症例に対してイヌ iPS 細胞を用いた再生獣医療のリスク評価は、マウスやラットを用いた研究では得ることのできない情報であり、ヒトにおける再生医療の実用化を円滑に進め得るものと考えられる。

1. Nishimura, T. et al. (2013) Generation of functional platelets from canine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*, 22: 2026-2035.
2. Whitworth, D.J. et al. (2014) Derivation of mesenchymal stromal cells from canine induced pluripotent stem cells by inhibition of the TGFβ/activin signaling pathway. *Stem Cells Dev*, in press. doi:10.1089/scd.2013.0634

iPS 細胞由来肝細胞を用いた医薬品安全性評価

国立医薬品食品衛生研究所 薬理部
石田 誠一

iPS 細胞由来モデル細胞の創薬応用は、薬効評価と安全性評価の適用に大きく分けられる。薬効評価は、創薬ターゲットに基づく疾患モデル細胞を用いた探索段階での利用が想定され各論的であるが、安全性評価はすべての新薬開発で実施される創薬プロセスを支える重要な共通基盤である。

なかでも、薬物性肝障害は未だに医薬品の市場撤退における要因の上位を占めており、医薬品開発の早期における的確な肝毒性予測は、使用者である患者の安全性の担保はもちろん、医薬品開発の迅速化やコスト削減にとって重要な課題となっている。現在は主にヒト由来の初代培養肝細胞が用いられているが、ドナーや調製時に起因するロット間差が大きく、安定供給や再現性で問題を抱えている。また、細胞の供給をほぼ 100%海外に依存しているため、日本人の安全性評価データを得ることが困難である。そのような背景のもとに、ヒト iPS 細胞より分化誘導された肝細胞が複数の供給元から市販されるに至り、再現性の確保や人種差の検討に期待が寄せられている。

国立衛研 薬理部では、一昨年度、昨年度と市販されている複数のヒト iPS 細胞由来肝細胞を入手し、薬物代謝酵素の活性発現や酵素誘導能、また、化学物質への毒性応答について継続的に検討を加えてきた。その結果、一昨年度に実施した試験に比べ、機能発現や再現性で向上が認められた一方で、解決すべき問題点も明らかとなってきた。

例えば、一部のヒト iPS 細胞由来肝細胞では、昨年度の評価試験で主要な薬物代謝酵素の一つであるチトクローム P450 (CYP) 3A4 の誘導性が認められた。現在、日米欧三極で医薬品開発における薬物間相互作用を評価するためのガイドライン、ガイダンスの策定が進んでおり、その中で、CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 の酵素誘導の *in vitro* での評価が求められている。現時点では、3 ドナー以上のヒト初代培養肝細胞を用いた遺伝子発現レベルでの評価が推奨されているが、そのうちの少なくとも 1 ドナー分をヒト iPS 細胞由来肝細胞で置き換えられれば、薬物相互作用評価における負担が軽減される。昨年度の評価で CYP3A4 の誘導性が認められた細胞を詳細に検討していくことで、そのような置き換えが可能となることが期待される。また、CYP3A4 の遺伝子及び酵素活性についても発現が一昨年度の評価時と比べ、より初代培養肝細胞に近づく傾向にあった。一昨年度の比較では初代培養細胞と比較して 2 ケタから 3 ケタ低い値しか示していなかったが、昨年度は 1 ケタ程度に差が縮まってきている。

一方で、その他の CYP 分子種や第 II 相薬物代謝酵素、トランスポーターなどの薬物代謝に関係する酵素を見ると、必ずしも十分な遺伝子発現や活性発現が得られていなかった。この状況を改善していくためには、液性因子による分化誘導法では限りがあり、ヒト iPS 細胞由来肝細胞の一層の成熟化のためにスフェロイド培養などの三次元培養が注目されている。我々も以前、ヒト肝癌由来培養細胞株 HepG2 を用いた研究で、HepG2 細胞を高密度に培養することで複数の薬物代謝酵素遺伝子の発現が亢進することを見出している (Horiuchi *et al. Biochem Biophys Res Commun.* 2009, **378**, 558-62)。iPS 細胞由来肝細胞でも同様の培養上の工夫が必要と考えられ、我々の研究室でも現在検討を進めている。また、肝臓の 30%程度は非実質細胞が占めており、肝

臓の機能は、70%前後を占める肝実質細胞のみで発現しているわけではない。iPS細胞から誘導される肝細胞は主に肝実質細胞であるため、非実質細胞と共培養することにより、iPS細胞由来肝細胞の成熟化が促進される可能性がある。更に、数万人に一人と言われる特異体質による薬物性肝障害には、免疫担当細胞であるクッパー細胞などの非実質細胞の関与も疑われており、この点からも共培養系が注目されている。iPS細胞から誘導される肝実質細胞を非実質細胞と共培養することで、より成体の肝臓に近い生物応答が期待される。特異体質による肝障害を臨床段階の限られた投与数から予測することは発生頻度から考えても困難である。そのため、非実質細胞を含む共培養系の開発は、医薬品安全性評価の今後の重要な検討課題となってきた。

医薬品の安全性評価から少し視野を広げ、化学物質の毒性評価まで見渡すと、肝毒性に限らず、モデル動物による質の高いデータの蓄積がある。毒性評価における種差の壁を超える為にも、また動物実験代替法の開発の観点からも、今後はモデル動物の細胞を用いた *in vitro* 試験とヒトとの比較解析も重要になると考えられる。ヒトのみならず、モデル動物から iPS 細胞を樹立し、肝細胞等を供給することは今後重要性が増すと思われる。獣医学領域とヒトの安全性評価研究との交流が望まれる。

【Ⅲ. 再生獣医療法の臨床現場での課題】

リンパ球を用いた細胞療法の現状とこれから

公立大学法人大阪府立大学
生命環境科学域附属獣医臨床センター
嶋田 照雅

近年様々な疾患の病態に免疫応答が密接に関係していることが明らかとなり、免疫応答調整の中心的役割を担うリンパ球を利用するさまざまな療法が開発されつつある。特にがん患者に対する免疫療法に関する研究はめざましく、T細胞受容体遺伝子やキメラ抗原受容体遺伝子を導入したリンパ球を用いた療法は、ある種のがん患者において寛解を導く程の効果を示すことが報告されている。また、最近ではiPS細胞から抗がん効果を示すリンパ球を作り出し、治療に応用しようとする試みも報告されている。一方、獣医療においても、人医療同様免疫療法は第4の抗がん療法として注目され、リンパ球を利用した治療法として活性化自己Tリンパ球療法（CAT療法）が多くの動物診療施設で行われるようになってきた。しかしながら、獣医療において免疫療法は新たな抗がん療法として注目されているが、明らかな効果のある治療法としてCAT療法が認知されているとは言い難い。その理由としては、獣医療において本療法の明確な効果が示されていないこと、効果を示す症例の特徴（がんの種類やステージなどを含めた適応症例）が不明であること、効果を評価する指標が明確ではないこと、治療実施に煩雑な手技が必要なことなどが考えられる。

CAT療法の効果は、人医療ではQOL改善効果、がん性腹水や胸水の改善、肝臓がんや肺がんの術後再発や転移の予防効果などが報告されている。著者の研究グループは、これまで帯広畜産大学附属動物医療センターや大阪府立大学生命環境科学域附属獣医臨床センターにおいて100頭をこえる犬の固形がん症例に対してCAT療法を単独、あるいは従来の治療法に併用して実施してきた。その結果、有意差が明確に示すにはまだまだ少ないデータではあるが、CAT療法を実施した全症例にQOLの改善が認められたこと、CAT療法単独では明らかながんの縮小は認められないが、CAT療法を従来の治療法と併用することによりがんの増大、再発や転移が抑制されたことなどの現象が観察された。また、CAT療法によりがんの増大、再発や転移の抑制が認められた症例では、末梢血リンパ球数、特にCD8陽性細胞数の増加やリンパ球のIL-2 mRNA発現量の増加が認められた。これらの現象は、CAT療法の効果として考えられるが、これら現象の発生機序を明確にしなければ、CAT療法の効果として示すことは難しい。そこで今後は、投与した活性化リンパ球のがん病巣への分布、奏功作用を示すリンパ球の種類、奏功作用の機序などについてさらに研究を進める予定である。CAT療法の効果発現機序が明らかになることにより、獣医療においてもリンパ球を用いた抗がん療法が、本当の意味で第4の治療法として期待される治療法として認知されるものと考えられる。また、獣医療におけるリンパ球を用いた新たな治療法の開発にも有益なデータとなるものと考えられる。

リンパ球は本来多くの種類が存在し機能も多様である。今後特定の機能を持った種類のリンパ球を誘導することが出来れば、様々な疾患の治療にリンパ球を利用した治療法が開発され普及するものと考えられる。これからの免疫療法に関する研究に大いに期待しつつ、著者の研究グループも研究を進めて行きたいと思う。

脊髄の一次損傷と二次損傷

椎間板ヘルニアや交通事故などのために、脊髄が損傷を受ける。この一次損傷によって、脊髄が衝撃や圧迫などの物理的損傷を受け、急激な外科的侵襲を受けることによって細胞などが瞬時に破壊される。そして脊髄はその後、内科的な二次損傷を起こしてさらに悪化していく。

脊髄損傷が悪化する二次損傷の機序は単純ではない。いろいろの化学的・生物学的ファクターが絡み合い、進んでいく。一次的に単に椎間板物質によって物理的圧迫を受けて脊髄が壊死するだけでは決してない。二次損傷においては、イオンチャネルの異常、細胞膜の損傷、アラキドン酸カスケードの異常、炎症、虚血、細胞死などなど、同時多発的に坂道を転げ落ちていくようにどんどん進んでいく。しかも数分、数時間の単位で進んでいくことから、筆者はこの疾病が救急疾患であることを再認識すべきであると考えている。二次損傷が進んで **Grade5** に到達すると、脊髄の再生が不可能となるおそれがある。

二次損傷は、具体的には瞬時の脊髄の衝撃などの一次損傷に引き続き、細胞破壊、出血、虚血、浮腫、炎症から始まり、アラキドン酸カスケードの活性化→→炎症性サイトカインやロイコトリエンの活性化→→好中球やマクロファージの集積→→好中球エラストラーゼと活性酸素の放出→→血管内皮細胞障害→→微小循環障害→→凝固・血栓→→脊髄の壊死→→瘢痕化へと突き進む。二次損傷のシステムはこれ以外にも数多くあり、同時多発的にどんどん進んでいく。二次損傷が進むごとに、麻痺は重症化し、不可逆的になっていく。麻痺の重い軽いという程度は、はじめに受けた脊髄損傷の程度も左右するが、この二次損傷がどこまで進んだかが大きく関わってくる。我々はこの二次損傷の進行をいかに早い時点で、いかに効率よくストップするかを考えるべきである。筆者らはこれらのカスケードのひとつを抑制するために、好中球エラストラーゼを阻害する薬剤と、活性酸素を中和する水素水を用いている。そしてさらに、炎症を鎮めて脊髄を修復するという役目を持つ他家幹細胞を用いている。

発症後 1 週間から 2 週間という時間が経過すると、脊髄の病変部には瘢痕組織が形成されはじめ、重症の場合には近位から遠位への軸索の連続性は最終的に 1~2 ヶ月掛けて完全に絶たれることがある。脊髄にこの瘢痕組織が形成されると、治癒は望めなくなり、脊髄の再生も非常に困難となる¹⁾²⁾³⁾⁴⁾。したがって脊髄損傷のあと、いかにその部位に瘢痕組織をつくらせないかというのが、治療の重要なひとつの鍵となる。臨床上の症状で表現すれば、いかに **Grade5** にさせないか、いかに慢性にさせないか、ということになる。軸索が近位と遠位の連続性を失ってしまえば、深部痛覚もなくなるのである。この瘢痕組織を作らせないこと、つまり炎症を抑えることが重要な鍵となるのである。

幹細胞療法について

当院では急性期を過ぎた脊髄損傷に対して、患者自身の脂肪から採取した間葉系幹細胞

胞（自家幹細胞）を培養してから投与することを実施している。また、急性の脊髄損傷に対しては、あらかじめ別の犬から採取した脂肪から採取した幹細胞（他家幹細胞）を培養しておき、その増殖した幹細胞を凍結保存しておき、必要時に解凍して即時に投与するということも実施している。もともと間葉系幹細胞の役割は、おおまかには次のように説明できる。骨髄由来も脂肪由来も同様に考えて良い。

1. 生体組織に脊髄損傷が起こったときに、損傷部位が「この部位が損傷した」というシグナルを血行に向かって発信する。
2. 間葉系幹細胞がシグナルを感知し、骨髄や脂肪などから発進し、血行に乗って身体全体を駆けめぐり、脊髄の損傷部を見つけて集積する（SDF-1/CXCR4 システム）。
3. 損傷部の組織の種類に応じて神経栄養因子などのサイトカインを分泌し、応急手当をする。（**BDNF**：Brain-derived neurotrophic factor、**GDNF**：Glial cell-line derived neurotrophic factor など）
4. 損傷部に血行を新生するサイトカイン、血管新生因子を分泌し血行を構築する。（**PIGF**：Placental growth factor など）
5. 損傷部位に応じて間葉系幹細胞が血管内皮細胞や神経細胞（未だ確定的な学説はない）に分化する。
より原状に近い組織の機能を回復する。

幹細胞の採取から培養まで

筆者が実施している治療は、脊髄の不全に陥った犬や猫の脂肪を麻酔下にて採取し、培養室で間葉系幹細胞を培養バッグにて培養、増殖した間葉系幹細胞を静脈に点滴するというものである。採取し、培養開始から2週間目に第1回目の投与。さらに1週間後に2回目。さらに1週間後に3回目。1回当たりの投与細胞数は約 $1\sim 3\times 10^7$ 個である。

現在の当院の取り組み

当院では、従来から亜急性期の症例に対し静脈への幹細胞投与を行なってきた。そして効果のあることを確認した。現在では急性期の重症脊髄損傷への対応も行なっている。

幹細胞が高い抗炎症効果を持つことは知られている。間葉系幹細胞は過剰な免疫炎症反応を調節制御していることが分かっている⁵⁾⁶⁾⁷⁾。**Bleomycin**による肺障害モデル⁸⁾、マウスの腹膜炎モデル⁹⁾などで、間葉系幹細胞の抗炎症作用が認められた。心筋梗塞のマウスのモデルにおいて、間葉系幹細胞は抗炎症タンパク質 **TSG-6** (**TNF- α stimulated gene/protein 6**) を作り、この **TSG-6** が心筋の虚血炎症部の過剰な炎症を抑制、さらに好中球やマクロファージから出される蛋白分解酵素から心筋を守るという作用をすることが分かった¹⁰⁾。こういった抗炎症作用は **TSG-6** の用量に依存性であることも分かっており¹¹⁾、間葉系幹細胞の数は多い方が良いということが言える。

急性期の脊髄損傷に対する他家幹細胞投与

このような抗炎症効果を持つ幹細胞を、脊髄損傷の発症直後に投与したい。2次損傷を進ませないためである。しかし、自家幹細胞を2週間という長い時間にわたって培養し、その細胞を投与するというのは、急性で重症の患者には遅すぎる処置となる。なんとか急性期に即座に幹細胞を投与したい。その方法は存在する。他家幹細胞である。一

般の組織にある分化した細胞を他の個体に移植すると拒絶反応を起こすことは知られている。しかしながら、ヒトの幹細胞研究においては、間葉系幹細胞は、アロ（他家）反応性リンパ球を刺激する共刺激（costimulatory）分子である B7-1, B7-2, CD40, CD40 リガンドを発現していないために、免疫原性（immunogenicity）がほとんど出現しない。そのため、HLA の異なった幹細胞を個体に投与しても、レシピエントにおけるリンパ球などの免疫細胞群に排除されないと考えられている¹²⁾¹³⁾。

このことが救いとなり、他家幹細胞移植を可能としている。つまり、重症の脊髄損傷を起こした犬に対し、2週間待った自家幹細胞ではなく、即座に投与できる他家幹細胞を用意すれば、発症直後の悪化の元凶である炎症を抑制し、2次損傷を食い止めることができる可能性が高まるのである。

当院では凍結保存しておいた他家幹細胞を解凍して即座に用いている。我々の研究によると、脂肪由来幹細胞をマイナス 80 度で凍結保存した場合、凍結した期間が長期であっても（1日～270日）、解凍時に約 70%の幹細胞が生存することが分かっている（未発表データ：担当 さくら動物病院 小林和恵）。このことによって、投与できる細胞数が 70%に減るということではなく、あらかじめ大量の幹細胞を凍結保存しておけば、いくらでも多くの幹細胞を入手し投与できるということである。もちろん体重によって投与できる幹細胞数を制限するガイドライン（日本獣医再生医療学会）は遵守する。

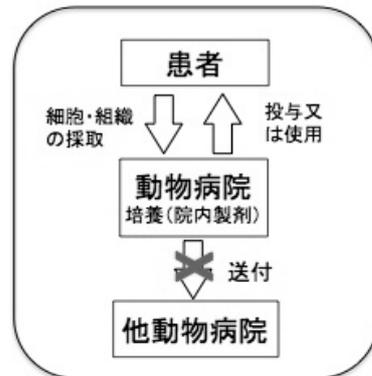
- 1) Hawthorne AL, Hu H, Kundu B, et al. The unusual response of serotonergic neurons after CNS injury: lack of axonal dieback and enhanced sprouting within the inhibitory environment of the glial scar. *J Neurosci.* 31(15):5605-5616, 2011.
- 2) Boido M, Garbossa D, Vercelli A. Early graft of neural precursors in spinal cord compression reduces glial cyst and improves function. *J Neurosurg Spine.* 15(1):97-106, 2011.
- 3) Hu R, Zhou J, Luo C, et al. Glial scar and neuroregeneration: histological, functional, and magnetic resonance imaging analysis in chronic spinal cord injury. *J Neurosurg Spine.* 13(2):169-180, 2010.
- 4) Kopp MA, Brommer B, Gatzemeier N, et al. Spinal cord injury induces differential expression of the profibrotic semaphorin 7A in the developing and mature glial scar. *Glia.* 58(14):1748-1756, 2010.
- 5) Prockop DJ, Kota DJ, Reger RL, et al. Evolving paradigms for repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs). *J Cell Mol Med.* 14(9):2190-2199, 2010.
- 6) Wan YY. Regulatory T cells: immune suppression and beyond. *Cell Mol Immunol.* 7(3):204-210, 2010.
- 7) Prockop DJ, Oh JY. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol Ther.* 20(1):14-20, 2012.
- 8) Ortiz LA, Dutreil M, Fattman C, et al. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(26):11002-11007, 2007.
- 9) Yagi H, Parekkadan B, Yarmush ML, et al. Reactive bone marrow stromal cells attenuate systemic inflammation via sTNFR1. *Mol Ther.* 18(10):1857-1864, 2010.
- 10) Wisniewski HG, Vilcek J. Cytokine-induced gene expression at the crossroads of innate immunity, inflammation and fertility: TSG-6 and PTX3/TSG-14. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15(2-3):129-146, 2004.
- 11) Oh JY, Roddy GW, Prockop DJ, et al. Anti-inflammatory protein TSG-6 reduces inflammatory damage to the cornea following chemical and mechanical injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(39):16875-16880, 2010.
- 12) HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells Katarina Le Blanc, Charlotte Tammik, Kerstin Rosendahl, Eva Zetterberg, and Olle Ringden, *Experimental Hematology* 31,890-896, 2003
- 13) Suppression of Allogeneic T-cell Proliferation by Human Marrow Stromal Cells: Implications in Transplantation, William T. Tse, John D. Pendleton, Wendy M. Beyer, Matthew C. Egalka, And Eva C. Guinan, *Transplantation*, 75(3): 389-397, 2003

獣医療分野における細胞治療の提供体制について

株式会社 J-ARM
岡田 邦彦

株式会社 J-ARM は名古屋大学医学部 組織工学講座発のベンチャー企業として、2006 年に設立された。以来、獣医療分野における細胞治療の普及を目的として、活性化リンパ球療法の受託培養を名古屋大学インキュベーション施設のラボにて行い、2007 年からは院内製剤の原則をもとに、活性化リンパ球(2007)、樹状細胞(2008)、骨髄幹細胞(2008)、脂肪幹細胞(2010)についてそれぞれ培養キットの開発を行い、販売を行っている。

現時点で動物病院内にて細胞治療を行う場合、医師主導型の有償臨床研究として、患者の主治医が培養管理を行う必要がある。動物病院内には簡便な培養施設を設置し、クリーンベンチ、CO₂ インキュベータ、遠心機等の培養機器を用いて、培養を行う。主治医は、培養後、細胞の製剤化を行い、病院内において患者への投与とその予後管理を行う。2014 年現在では細胞治療を行う病院は 222 を数え、その細胞培養のトラブルシューティング対応や細胞治療に関する最新の知見提供、また症例データの回収と解析を行っている。

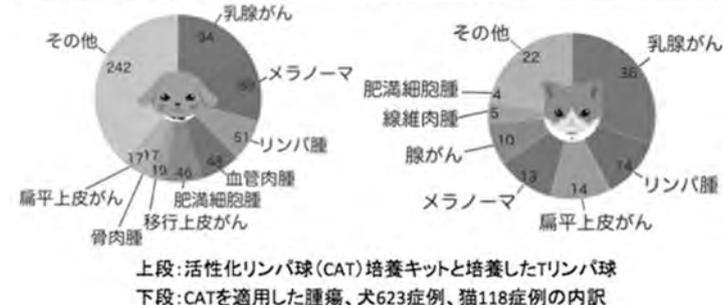
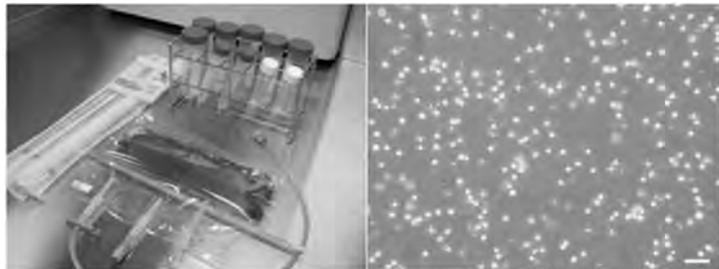


獣医療分野における培養細胞の院内製剤の概略



動物病院内での細胞培養

一般的な動物病院が細胞治療を行うことは、上記の簡単な設備さえ整えることができれば、コスト的にも技術的にもそれほどハードルが高い治療法ではない。加えて、我々が開発した細胞培養キットを用いることで、無菌操作など基本的な細胞培養技術さえ習得すれば、目的の細胞を培養することができる。このことから、細胞治療は、高度な設備を揃えた大学病院や二次診療施設でしか行えない治療



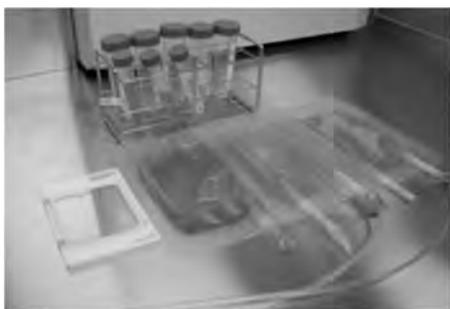
ということではなく、一般的な街の動物病院にも充分普及しうる治療法であると考え、細胞治療の営業・啓蒙活動や動物病院同士のネットワーク作りを行っている。

これまで、J-ARM ではヒト医療における細胞治療の臨床研究の報告をベースとして、細胞治療推進の根拠の一つとしてきた。現在、犬猫特異的な症例データとエビデンスを確立するべく、細胞治療の奏効解析データの収集と解析を行っている。

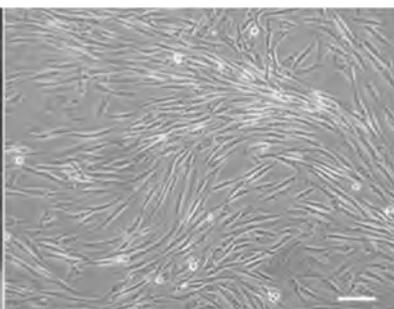
る。

細胞免疫療法については、主に活性化リンパ球(CAT)療法のデータを中心に蓄積し、延命期間、再発・転移率に着目した統計解析を行っている。これまでの活性化リンパ球療法は、それ自体では腫瘍そのものの縮小などには切れ味は悪いが、外科手術や化学療法、放射線治療の三大療法を併用する補助的な治療法として、完全切除や減容積を図った後に、腫瘍再発や転移抑制、そして常態のQOL維持を目的とする治療の選択肢として、動物病院に受け入れられている状況である。

皮下脂肪由来の間葉系幹細胞療法は、パチンコ玉程度の皮下脂肪を採取できれば、そこから1千万個程度の間葉系幹細胞を増幅できるキットを用いて細胞を準備する。適用疾患としては、当初は骨折の癒合不全や、慢性関節炎、椎間板ヘルニアなどの外科疾患の治療に使用することから始まったが、腎炎や肝不全、膵炎などの内科系疾患に始まり、



脂肪幹細胞(ADSC)培養キットと、培養した犬由来の脂肪幹細胞



り、現在では、乾燥性角結膜炎や免疫介在性関節炎、アトピー性皮膚炎や免疫介在性の貧血など、自己免疫性疾患への臨床研究が進められており、データの収集が行われている。間葉系幹細胞によるこの広範

囲な疾患適用の背景には、間葉系幹細胞が持つサイトカイン放出による血管新生や組織修復だけではなく、抗炎症機能や免疫抑制(調整)作用などの機能が働いていることが考えられる。また、間葉系幹細胞は凍結による保存が可能であり、同時に、その免疫原性の低さから、他家幹細胞移植もその可能性が期待されている。治療法がない疾患に限らず、緩和療法や補助療法の担い手としても、間葉系幹細胞の適用疾患は今後ますます広がってくることが予想される。

獣医療においてこれまでに幹細胞を適用した臨床的研究

骨髄疾患	自己免疫疾患
<ul style="list-style-type: none">・椎間板ヘルニア・変形性脊椎症・変性性脊髄症(DM)・脊髄梗塞、小脳梗塞など中枢神経系梗塞	<ul style="list-style-type: none">・乾燥性角結膜炎・アトピー性皮膚炎・免疫介在性関節炎・非再生性再生不良性貧血
内科系疾患	その他
<ul style="list-style-type: none">・インシュリン依存・非依存型糖尿病・慢性肺炎・慢性肝炎・肝不全・肝硬変・腎炎・慢性腎疾患	<ul style="list-style-type: none">・皮膚創傷

J-ARM

獣医療分野における細胞治療は、その適用疾患などにおいてまだ未知数なことも多いことが現状ではあるが、2013年12月に発足した日本獣医再生医療学会(<http://jvrm.jp>)は、各動物病院で行った症例を報告し、議論する場として非常に有用である。院内製剤における細胞培養の方法、安全性、適用疾患、投与方法など、獣医療分野での細胞治療のガイドライン作りも学会が中心となって、進め

られている。学会を中心に、細胞治療を行っている動物病院、弊社のような企業、そして獣医系大学の研究者が、共に共同研究や症例の解析などにおいて、協力することによって、獣医療分野における細胞治療がますます発展していくことは間違いないと考える。

脊髄損傷は、交通事故や落下事故などの外傷性の原因と椎間板ヘルニアや脊髄腫瘍などの内的原因によって障害が発生する。近年、獣医学領域においては、M.ダックスフント、フレンチブルドックなどの登録犬数の増加に伴い臨床の現場で椎間板ヘルニア、脊椎不安定症などが原因の脊髄損傷を伴った症例が多くみられるようになった。それらの中で、椎間板ヘルニアの神経学的グレード5 (IVDH-G5)症例は、従来の治療方法では術後回復率に限界があり、臨床上の問題となっている。発症時の初期治療として、1950年代より、片側椎弓切除術、背側椎弓切除術がおこなわれてきたが術後回復率は33~76%¹⁾²⁾であり、約半数の症例では後肢の対麻痺が改善しない。これらの症例が外科的治療をうける時期は脊髄損傷の急性期であると考えられる。脊髄損傷の急性期は、機械的な障害である一次損傷と、それに引き続き起こる生化学的反応によって障害が拡大する二次損傷からなる。近年、脊髄再生医療の研究において様々な細胞が注目されており、その中にはiPS細胞、ES細胞、シュワン細胞、マクロファージ、神経幹細胞、嗅神経鞘細胞、脈絡叢細胞、表皮神経提幹細胞、及び骨髄間質細胞などの培養細胞があり、それぞれの細胞を用いた動物実験において脊髄再生を示す結果が報告されている³⁾。しかしながら、培養細胞を用いた治療方法は、培養細胞の品質管理、細菌感染のリスク、腫瘍化への懸念、コスト、設備などさまざまな臨床上の問題点が指摘されている。

我々は、脊髄損傷症例に対して骨髄由来の細胞（培養細胞および非培養細胞）を用いた臨床研究をおこなってきた。今回、IVDH-5に症例を絞り、非培養の自家骨髄由来単核細胞(bone marrow-derived mononuclear cells 以下BM-MNC)を用いた治療方法と臨床成績について報告する。

全身麻酔下において、上腕骨近位の骨髄穿刺により骨髄液を採取した後、比重液(Lymphoprep)を用いてBM-MNCを遠心分離した。BM-MNC移植細胞数は、 $4.5 \times 10^6 \sim 2.3 \times 10^9$ であった。すべての症例に対して片側椎弓切除術を実施し、逸脱椎間板物質を除去した直後に脊髄くも膜下腔にBM-MNCの移植をおこなった。術前および術後に血液検査、神経学的検査、SEP検査、CT検査、MRI検査を実施した。

結果、27症例中24症例(88.9%)で歩行回復およびSEPの回復を認めた。同施設においてBM-MNCを移植していないIVDH-G5症例の術後歩行回復率(n=46)は56.5%であった(第79回獣医麻酔外科学会)。また、全症例において移植後の合併症は認めなかった。

今回、我々は、軸索再生能の促進や神経保護などの効果を期待し、BM-MNCの移植術を行った。BM-MNC移植後の歩行回復率は、コントロール群に比較して有意な差が得られたため、移植したBM-MNCが、脊髄の再生に関与した可能性が示唆された。今後はBM-MNCが脊髄再生に関与するメカニズムをより詳細に解明していく必要があると考えられた。

参考文献

- 1) Butterworth SJ, et al. Follow-up study of 100 cases with thoracolumbar disc protrusions treated by lateral fenestration. *Journal of Small Animal Practice* 1991;32:443-447.
- 2) Anderson SM, et al. Hemilaminectomy in dogs without deep pain perception. A retrospective study of 32 cases. *California Veterinarian* 1991;45:24-28.
- 3) Ide C, et al. Bone marrow stromal cell transplantation for treatment of sub-acute spinal cord injury in the rat. *Brain.Res.*2010;1332:32-47.

10) 再生医療等製品製造（予定）施設見学の報告

【第1回施設調査概要報告】

施設名	日時	参加委員名
大日本住友製薬株式会社 神戸再生・細胞医薬センター	H26.9.30 午後	笠嶋、嶋田、濱岡、 平山、（小川）
大阪府立大学りんくうキャンパス	H26.10.1 午前	笠嶋、濱岡、平山、 （小川）
株式会社 J-ARM	H26.10.1 午後	笠嶋、濱岡、平山、 （小川）

I. 大日本住友製薬株式会社 神戸再生・細胞医薬センター

1. 対象の研究・製品開発等

主に脳梗塞・加齢黄斑変性等の治療開発を目指し、間葉系細胞・iPS細胞を用い、他家製品を対象。

2. 施設

施設は、神戸市のポートアイランド内にある神戸医療産業都市の一角で、下記の4箇所に分かれており、全てレンタル。本年4月から稼働。

先端医療センター：「P2 実験室」と称し、再生医療および細胞医薬に関する研究を実施。iPS細胞等の作製・保存する室、それらを分析する室、その他の生化学検査をする室の3室に区分されている。前2室にはそれぞれ安全キャビネット等が設置。

神戸バイオメディカル創造センター：「CPC 棟」と称し、細胞生産施設で、3室の独立した室に閉鎖式アイソレータ、ロボット型培養装置等設置。制御室から環境をモニタリング。

神戸臨床研究情報センター：「QC 室」と称し、品質検査を実施。2室に区分され、自動細胞計数機等高額な検査機器を設置。

3. 所感

人用の再生医療等製品の製造・研究施設であり、最先端の施設・機器等備えている。これらと同等のものを動物用に求めることは、市場規模からもコスト的に無理であろう。ただ、自社工場でなくレンタルラボでも可能であることは、注目された。



II. 大阪府立大学りんくうキャンパス

1. 対象の研究等

イヌ・ネコ iPS 細胞由来血小板の作製および活性化リンパ球療法等

2. 施設

獣医学専攻・先端病態解析学領域・細胞病態学教室：3 室からなり、iPS 細胞の実験は奥の P2 レベルで実施。

附属獣医臨床センター：センター内の 1 室でヘパフィルターを備えた陽圧式の簡易無菌室(5~10 m²ほど)でクリーンベンチと培養装置を設置 (ガスバーナーを使用せず)。



- 簡易無菌室 -

3. 所感

iPS 細胞の作製は、通常の大学の研究室ででき、活性化リンパ球の培養は、簡易無菌室があればコンタミしないことに注目。

Ⅲ. 株式会社 J-ARM

1. 対象の研究等

活性化リンパ球・脂肪肝細胞療法等の技術指導および培養キット等の販売

2. 施設

通常の家屋を改装して使用、部屋入口にビニールカーテンで仕切った前室（着替え空間）を確保。クーラーと空気清浄機を設置、クリーン-ベンチ 3 台、炭酸ガス培養器、遠心機、顕微鏡、冷蔵庫等。他に培養トレーニング用の室もある。

3. 所感

製造施設として関係法令をクリアするためには新たな対応が必要。

【第2回施設調査概要報告】

施設名	日時	参加委員名
日本全薬工業株式会社	H26.10.22 午後	小沼、笠嶋、濱岡、 平山、山口、(小川)
株式会社アステック	H26.11.5 午後	濱岡、平山、岡田、 (小川)

I. 日本全薬工業株式会社

1. 対象の研究・製品開発等

現在、再生医療に関連する研究・製品開発等は実施していないが、400種類以上の動物用医薬品を取り扱っており、本年6月には犬のアトピー性皮膚炎の減感作療法薬（カイコバキュロウイルス系で製造）を発売している。細胞冷凍保存液の製造や組換え蛋白の受託製造も実施している。

2. 施設

動物用医薬品メーカーの施設であり、遺伝子組換え実験用施設、感染実験用施設、製造施設等があり、製造施設は動物用医薬品の製造棟、ヒト用原料製造に対応可能な新しい細胞培養プラントなどが整備されていた。これら製造棟は、いずれも薬事法など法令に準拠した設備となっており、クリーンブースの利用を含めて5～7段階の清浄度管理で運用されていた。

3. 所感

ヒト用医薬品を製造可能な施設については、ハード面では法令に準拠しているため、ソフト面での整備がなされれば、少なくとも動物用再生医療製品を製造することには何ら問題はないと考えられる。



クリーンルーム
入室時の着替え
の様子

II. 株式会社アステック細胞科学研究所

1. 対象の研究、製品開発等

細胞培養に係る試薬、培地及び機器等の製造及び販売、培養技術の開発、細胞実験受託等の実施。



～ 細胞培養室 ～

2. 施設

施設は、主に前室、着衣室（一次及び二次）、脱衣室（一次及び二次）、保存室、細胞調製室、細胞培養室からなり、陽圧の3段階で清浄区域を運用していた。細胞培養室は、顕微鏡、4台のマルチガスインキュベーター、セーフティキャビネット、空調設備等が配置されており、iPS細胞や間葉系幹細胞の培養も可能である。しかしながら、細胞培養室の排気が床の全面となっている点に改良の余地がある。

3. 所感

モデルラボ的な施設であり、比較的小規模でも細胞培養用機器とラボが一体的に設計されると細胞培養の受託が可能な一定以上の高機能ラボが実現できると思われた。施設のキャパシティやGMP対応などの詳細については今後の課題となるのではないかと。

【第3回施設調査概要報告】

施設名	日時	参加委員名
株式会社ケーナインラボ	H26.12.11 午前	小沼、犬丸、笠嶋、平山、 (能田アドバイザー及び事務局小川)

1. 対象の研究・製品開発等

細胞免疫療法の技術サービス及び培養液販売、産業動物への免疫強化法としての活性化リンパ球療法を応用した技術開発及び提供、その他にコンパニオンアニマルの遺伝子検査やモノクローナル抗体等の研究用試薬開発を実施している。



簡易無菌室

2. 施設

東京農工大学ベンチャーポート内の1室で、事務室の一角に陽圧式簡易無菌室(2m×2m程度)を設置しており、クリーンベンチ、インキュベーターが配置されている。なお、ガスバーナーは使用しない。ソフト面においては、標準操作手順書(SOP)を設け、SOPに基づいて実験を実施している。

3. 所感

簡易無菌室は写真のとおり、大阪府立大学と同様のものではあった。自己細胞を培養するには、十分な施設と思われた。