

平成 2 8 年度－平成 2 9 年度

再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業

(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開発事業 (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	皮膚再建に用いる同種培養皮膚の基礎研究ならびに製品開発
研究開発代表者 所属 役職 氏名	再生医療事業（皮膚領域） 首席 井家益和

目次

1. 事業の目的	2
2. 実施内容及び結果.....	4
3. 評価手法等の開発・製造工程合理化のための検討内容	9
4. まとめ	55

1. 事業の目的

本研究では、わが国の再生医療産業を盤石なものとするために、大量生産を前提とする同種細胞を用いた再生医療製品の開発を行った。国内で上市されている再生医療等製品は現在 4 品目あるが、何れも国内市場は大きくない。一方、海外では同種細胞を用いて大量生産する再生医療製品が、年間 100 億円を越える売上に達している。わが国の再生医療産業の発展には製造原材料となる国産の同種セルバンクの整備が急務であり、同種細胞を用いて大量生産できる製品が上市されれば大きな国内市場を形成することが期待できる。

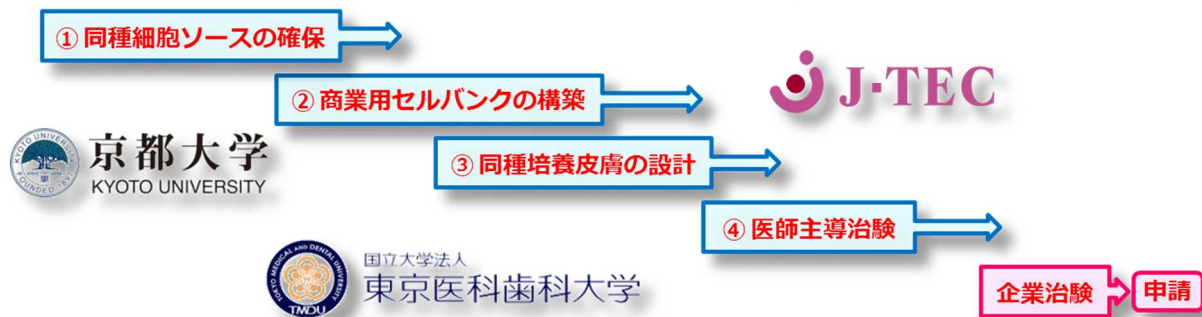
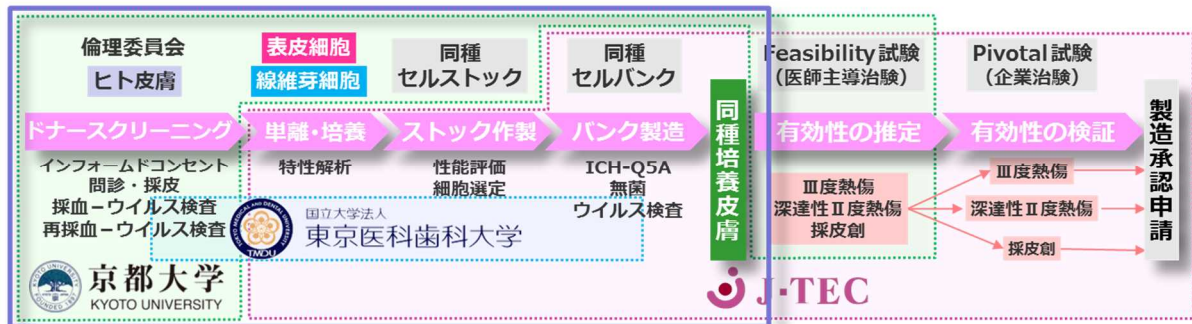
本事業で開発する製品は、海外で成功例のある同種培養皮膚である。同種細胞を用いた製品の品質管理、セルバンク等の構築、ならびに管理方法等を標準化することによって、同種細胞製品を輩出しやすい国内環境を構築することが目的である。

同種培養皮膚は、新生児由来の表皮細胞や線維芽細胞を組み込んだ細胞加工品であり、皮膚再建に用いる。何れの細胞も京都大学病院において外科手術時に廃棄される皮膚から分離・培養され、大規模なセルバンクの構築を経て、細胞培養されて製品となる。同種培養皮膚は移植部に生着することではなく、主に細胞が産生する生理活性物質によって創傷治癒を促進する **biological dressing** として作用する。凍結保存して用時融解できる製品を目指しており、受傷直後から使用することによって、救命率向上、治療期間短縮、瘢痕拘縮抑制、さらには医療費削減につながる効果が期待できる。



同種培養皮膚の製品化には、ヒト組織入手に関する対応、培養した細胞の特性解析、セルバンク構築、および製品仕様や品質設計が必要である（上図）。具体的には、医療機関における倫理的手続、ドナースクリーニング、皮膚の採取と輸送の実務や、細胞の性能やウイルス安全性、製造法と製品仕様の設定、品質と安全性を担保する出荷試験等の検査法の検証など、多岐に渡る評価手法を開発する必要がある。本研究では、これらを一連の開発手法として確立し、同種細胞を用いた再生医療の産業化に向けて標準化することができた。

本事業で取り組んだ開発スキーム



本研究の執行にあたり、製品開発の過程を「1）同種細胞ソースの確保」、「2）商業用セルバンクの構築」、「3）同種培養皮膚の設計」、「4）医師主導治験の実施」の4段階に分け、京都大学および東京医科歯科大学とともに開発スキームを構築した（上図）。

これらの研究内容に関する成果を次項にまとめた。

2. 実施内容及び結果

1) 同種細胞ソースの確保

ドナースクリーニング項目策定

ウインドウピリオド対応

ドナースクリーニング、セルバンクおよび最終製品に対して担保する安全性レベルについては、準拠すべきガイドラインが存在するが、その試験方法、基準等の詳細な記載はないため、規制当局と相談しながら、実施者が詳細を設定する必要がある。本研究では、原材料となる同種皮膚組織・細胞に関して、生物由来原料基準（生原基）およびヒト（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（同種指針）等への対応状況を提示し、同種細胞ソースとなるヒト皮膚を採取する際のドナースクリーニングに関する安全性評価スキームを構築した。

表皮細胞については 2016 年 2 月および 2016 年 7 月に、線維芽細胞については 2017 年 3 月に実施した薬事戦略相談対面助言（再生医療等製品等の品質及び安全性に係る相談）において、ウインドウピリオドを勘案したドナーの再採血を含む詳細な検査項目について PMDA と合意した。

皮膚の採取と培養、ウイルス検査

同種細胞ソースは、京都大学の倫理委員会の承認を得て商業利用可能なルートを確認した。京都大学がインフォームドコンセント（IC）、皮膚採取、採血およびウイルス検査、株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング（J-TEC）が細胞培養と特性評価、東京医科歯科大学が NAT によるウイルス検査を実施する体制を整えた（図 1）。

京都大学が商業利用可能な皮膚組織に関して、計 10 例のドナーから商業的臨床利用可能な皮膚組織に関する同意を得て採取した乳幼児由来組織を、J-TEC が受け入れ表皮細胞と線維芽細胞を分離して培養した。



図 1 皮膚採取とドナースクリーニング、細胞ストック作製のための体制

文書整備等の体制構築

ドナーに対してウインドウピリオドを勘案した再検査を実施することについて京都大学倫理委員会に再承認を得るために、京都大学における文書整備、およびウイルス検査会社の対応を含む実施体制を構築した。

東京医科歯科大学にて実施するウイルス検査については、信頼性基準を満たすための体制整備として、ウイルス検査を「申請資料の信頼性の基準」に基づいて実施する方法について J-TEC と協議書を作成し、検査に係る文書を整備した。

ヒト組織採取体制の検証/評価

同種細胞ソースに関して、社会の認知、同意取得、仲介機関の必要性、品質管理体制、医療機関の負担、提供の負担、情報管理体制、契約関係等について、IC や組織採取の実務を通して再度検証した。

2) 商業用セルバンクの構築

表皮細胞・線維芽細胞の特性解析

商業用セルバンクの構築にあたり、表皮細胞と線維芽細胞の特性を把握するとともに品質の幅を推定する目的で、研究用の皮膚組織から分離・培養した細胞の特性解析を実施した。

表皮細胞・線維芽細胞のストック作製

商業用セルバンクの構築を目的として、京都大学にて IC が得られた 10 例のドナーから皮膚組織を受け入れた。

受け入れた皮膚組織より表皮細胞および線維芽細胞の分離を行い、表皮細胞は 3T3-J2 細胞のフィーダー法で培養を行い、線維芽細胞は外植法にて遊走細胞を培養した。表皮細胞は 1 継代、線維芽細胞は 2 継代に相当する細胞をそれぞれ回収し、セルストックを作製した。

表皮細胞・線維芽細胞のセルバンク作製

表皮細胞は増殖が良好な 4 例のセルストックを選定後、各セルストックを継代培養して細胞数を拡大し、GCTP 省令（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）に従って製造原材料の候補となるマスターセルバンク（以下、MCB）、ワーキングセルバンク（以下、WCB）および CAL（製造のために *In vitro* 細胞齢の上限にまで培養された細胞）を構築した。CAL 作製に至るまでに 1 例の細胞増殖が低下したため、残りの 3 例をセルバンクの候補とし、MCB、WCB、CAL に対する安全性および品質評価試験を実施した。安全性評価試験として、核型分析試験、無菌試験、マイコプラズマ否定試験を実施し、品質評価試験として 3 例の WCB 由来の培養表皮を作製し、培

養表皮の生細胞数、生理活性物質量を測定した。それらの結果を総合的に評価して ICH-Q5A のウイルス試験に供する最適なセルバンク 1 例を選択した。

線維芽細胞はセルストック 10 例から、増殖が良好な 3 例を選定し、セルバンクの候補とした。

表皮細胞・線維芽細胞の ICH-Q5A 対応

商業用セルバンクのウイルス検査項目に関して、表皮細胞については 2016 年 2 月および 2016 年 7 月に、線維芽細胞については 2017 年 3 月に薬事戦略相談対面助言（再生医療等製品等の品質及び安全性に係る相談）を実施し、提案したウイルス安全性評価のスキームと商業用セルバンクに対する検査項目について PMDA から受け入れ可能であると判断された。

選定したドナー由来の表皮細胞セルバンクに対する ICH-Q5A に対応したウイルス検査を実施した。

セルバンクスケールの評価

本研究で構築した MCB のスケールをセルバンク構築時の細胞増殖の経過および培養表皮の試製造の結果より試算を行った。その結果、同種培養表皮の最終製品を 1000 万個以上製造でき、年間数十万個の製品を出荷した場合でも、半世紀以上にわたって製造可能であると判断した。

3) 同種培養皮膚の設計

表皮細胞・線維芽細胞の培養法の評価

i) 表皮細胞の培養

商業セルバンクの構築の目的で受け入れた 10 例の皮膚組織から分離・培養した表皮細胞は、自家培養表皮ジェイス®の製造工程に準じて培養し、ジェイス®製造時と同等もしくは同等以上の順調な増殖経過を示した。

ii) 線維芽細胞の培養

線維芽細胞は、皮膚組織の真皮の外植法によって分離・培養した。本研究において、生原基に適合し、かつ市販培地と同等の細胞増殖能を示し、血管新生誘導能を有する未成熟型の線維芽細胞が培養可能な線維芽細胞専用培地を新たに開発した。

この開発した改良型線維芽細胞専用培地を用いて、商業セルバンクの構築の目的で受け入れた 10 例の皮膚組織について真皮外植法によって線維芽細胞を培養した。その結果、培養 2 週間以内に細胞の遊走を確認し、2 継代に相当する細胞を回収し、セルストックを作製することができた。

細胞種、材料、凍結仕様の策定と決定

本研究で開発する同種培養皮膚に組み込まれる細胞種は、ヒト表皮細胞およびヒト線維芽細胞である。

表皮細胞と線維芽細胞を組み込んだ培養皮膚の製品仕様は、表皮細胞を用いた「培養表皮」、線維芽細胞を用いた「培養真皮」および両方の細胞を用いた「複合型培養皮膚」が想定できる。われわれは「同種培養表皮」と「同種培養真皮」の設計を行うにあたり、以下の i) ～ iv) に関して製造工程における材料や凍結仕様を検討した。

- i) 同種培養表皮のパッケージ仕様の開発
- ii) 同種培養表皮の凍結法の開発
- iii) 同種培養表皮の凍結保存・解凍方法の開発
- iv) 同種培養真皮の凍結法の開発

工程由来物残留量と遺伝学的評価の検証

製品化を想定する同種培養表皮と同種培養真皮について、最終製品の安全性評価として工程由来物の残留量や核型分析等の予備試験を行った。特に、凍害防止剤として用いる DMSO の残留について検討した。

生理活性物質産生と動物移植試験の検証

製品化を想定する同種培養表皮と同種培養真皮について、最終製品の有効性評価として最終製品における生理活性物質の産生能を評価するとともに、同種培養表皮と同種培養真皮における動物を用いた評価法探索試験を実施した。

同種培養表皮の有効性評価試験として、糖尿病マウスの全層欠損モデルとラット全層皮膚欠損網状自家植皮併用モデルに対するヒト培養表皮の移植試験を行った結果、対照群に比較して培養表皮移植群の明らかな創収縮が確認された。また同種培養表皮は創傷治癒に関与する因子が多数産生していることを確認した。

同種培養真皮の有効性評価試験として、ラット全層欠損モデルに対するヒト培養真皮の移植試験を行った結果、生分解性メッシュのみを移植した群よりも、ヒト線維芽細胞が組み込まれた培養真皮移植群の方が、肉芽の形成が良好で、創傷部位の表皮の伸展が発達することを確認した。また、ヒト培養真皮を作製して血管新生誘導能を評価した結果、血管内皮細胞のネットワークが形成されることを確認し、同種培養真皮の移植時に血管新生誘導能により、創傷治癒効果が発揮されることが示唆された。

品質設計と出荷規格の策定と検証

開発する同種培養皮膚の製造に用いる原材料および資材については、受け入れ基準を設定し、安

全性および製品品質への影響を確認する必要がある。使用する表皮細胞および線維芽細胞については、それぞれの細胞の特性解析や形態、製造工程由来不純物試験、無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験、核型分析、ウイルス検査、力価試験等を行い、同種培養皮膚の特性に応じた品質設計を行って過不足のない適切な出荷検査を選定する必要がある。本研究では同種培養表皮の工程内管理項目および出荷検査項目を策定し、その妥当性について検討した。

4) 医師主導治験の実施

治験プロトコル骨子の策定と相談

同種培養表皮を用いた重症熱傷を対象とした臨床試験を **Feasibility study** として実施するために、京都大学と共同で治験プロトコルを作成した。この **Feasibility study** のユニークな所は、同一患者内で深達性Ⅱ度熱傷創またはⅢ度熱傷創、および採皮創の 3 種類の創を対象として評価する手法を試みる点である。

3. 評価手法等の開発・製造工程合理化のための検討内容

再生医療等製品の原材料となる国産の同種セルバンクの製造ルールを確定

【規制上の要求事項等との関係】

同種培養皮膚の製品化には、倫理的に適切なドナースクリーニングと適切な手続きを経て採取されたヒト組織・細胞の原料入手および製品の原材料となる商業用セルバンクの構築が必要である。商業用セルバンクは、同種セルストックから GCTP に従って構築される必要がある。

同種細胞製品は感染症伝播の問題が懸念されるため、ドナースクリーニングは、倫理面の課題のみでなく、ウイルス等の感染症に対する問診や検査項目の設定が重要であり、さらに商業利用を含むインフォームドコンセント（IC）においても十分な配慮が求められる。

われわれは、京都大学との共同開発を通して学内の倫理委員会の承認を得て、商業利用可能な同種細胞ソースの入手ルートを確保した。京都大学が IC と皮膚採取を行い、J-TEC が同一皮膚から表皮細胞と線維芽細胞の分離・培養を行って同種セルストックを作製する。同種セルストックは京都大学が管轄し、管理業務を J-TEC に委託する枠組みである。さらに、他のアカデミアや企業が、このセルストックを用いて臨床研究や製品開発を行うことを妨げない。

皮膚採取や同種細胞の取り扱いについては、「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）および「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 3 号）の指針に従って計画した。

原材料となる同種皮膚組織・細胞の安全性評価スキームの構築

【既存法の問題点の解決】

指針にはドナースクリーニングに対して担保する安全性レベルについて、検査が必要なウイルスや、聴取や問診を行う病歴の項目について記載されているものの、具体的なウイルス検査法や病歴を確認した場合の対応については明示されていない。また、セルバンクおよび最終製品に対して担保する安全性レベルについてもその試験方法、基準等の詳細な記載はない。

本事業の中で規制当局と相談することにより、その詳細を設定することができた。具体的には、原材料となる同種皮膚組織・細胞に関して、生原基および指針等への対応状況を提示し、同種細胞ソースとなるヒト皮膚を採取する際のドナースクリーニングに関する安全性評価スキームを構築した。

1) 同種細胞ソースの確保

ドナースクリーニング項目策定

同種細胞ソースとなるヒト皮膚を採取する際のドナースクリーニングに関する安全性評価スキームを構築するため、生原基および同種指針等に則った検査計画を立案した。皮膚を採取する際のドナースクリーニングに関して、同種培養表皮を相談品目とした薬事戦略相談対面助言（再生医療等製品等の品質及び安全性に係る相談；2016 年 2 月および 2016 年 7 月実施）を行い、設定した詳細

な検査項目について PMDA と合意した。具体的には、ドナースクリーニングとして、術前検査における血清学的試験、問診、および皮膚採取時の採血を用いた血清学的試験を策定した。

通常行われる術前検査における血清学的試験の結果から、B 型肝炎ウイルス（以下、HBV）、C 型肝炎ウイルス（以下、HCV）、および梅毒が全て陰性の場合に、ドナー適格と判断した。また、術前に被験者もしくは代諾者に対して IC を得るとともに、これまでの既往や輸血歴・海外渡航歴等の項目を含む問診を行い、適格性が確認されたドナーを対象とした。

また、皮膚組織の採取時に採血し、HBV、HCV、ヒト免疫不全ウイルス（以下、HIV）、成人 T 細胞白血病ウイルス（以下、HTLV）、ヒトパルボウイルス B19（以下、PVB19）、サイトメガロウイルス（以下、CMV）、エプスタイン・バールウイルス（以下、EBV）に対する血清学的試験を実施した。

ウイルス安全性評価のスキームとして、組織採取前における術前検査の血清学的試験と問診、組織採取時およびウインドウピリオドを勘案した再検査時の血清学的試験、組織処理時の皮膚組織および細胞に対する NAT、セルバンク製造時の ICH-Q5A に対応したウイルス検査と NAT を実施し、同種細胞ソースとしての安全性を確認した（表 1）。

表 1 ウイルス安全性評価のスキーム

項 目	術前検査	問 診	組織採取・採血	組織・分離細胞	再採血	セルバンク
時 期	手術前	手術前	手術日	組織処理時	採取後半年	セルバンク作製時
検 体	血清	—	血清	皮膚および細胞	血清	細胞
方 法	血清学的試験	問診票	血清学的試験	NAT	血清学的試験	NAT ICH-Q5A

線維芽細胞については、2017 年 3 月に薬事戦略相談対面助言を行い、表皮細胞と同様に考え、同項目のウイルス安全性評価のスキームを設定し、PMDA から受け入れ可能であると判断された。

すなわち、ドナースクリーニングとセルストック作製の過程で実施される問診やウイルス検査の項目は、細胞種に依存しない有益な指標であることが示唆された。

皮膚の採取と培養、ウイルス検査

京都大学が商業利用可能な皮膚組織に関して、目標とする全 10 例のドナーから同意を得て、手順に従って皮膚の採取と採血を行った。何れも同日に採取皮膚を J-TEC 担当者が受領するとともに、血液を検査施設（ファルコバイオシステムズ）に送付した。

ドナー 10 例は、多指症や副耳などを有する 3 ヶ月齢～1 歳の幼児であった（表 2）。何れも代諾者からの IC を得た後、組織採取前に術前検査による血清学的試験および問診によってドナー適格性を

確認した。なお、IC 取得に関しては、ウインドウピリオドを勘案した再採血に抵抗があり、代諾者の同意が得られないケースがあった。

ドナー10 例に対する組織採取時および再検査時の血清学的試験の結果、2 例が不適格となった。

組織採取時の血清学的試験の結果、1 例で PV B19 抗体の陽性が確認され、不適合となった。また 1 例は、ウインドウピリオドを勘案した再検査時期の超過により不適合となった。

表 2 ドナー情報

症例	年齢 / 性別	備考
症例 1	1 yr 0 mo / 男性	IC、術前検査および問診の上、組織採取および採血を実施。
—	(1 yr / 男性)	再採血に抵抗があり同意せず。
症例 2	1 yr 10 mo / 男性	IC、術前検査および問診の上、組織採取および採血を実施。
—	(3 mo / 男性)	代諾者の同意が得られず。
症例 3	1 yr 1 mo / 女性	IC、術前検査および問診の上、組織採取および採血を実施。
症例 4	3 mo / 男性	IC、術前検査および問診の上、組織採取および採血を実施。
症例 5	1 yr 4 mo / 女性	IC、術前検査および問診の上、組織採取および採血を実施。
症例 6	1 yr 1 mo / 男性	IC、術前検査および問診の上、組織採取および採血を実施。
症例 7	1 yr 2 mo / 男性	IC、術前検査および問診の上、組織採取および採血を実施。
症例 8	1 yr 2 mo / 男性	IC、術前検査および問診の上、組織採取および採血を実施。
症例 9	1 yr 7 mo / 女性	IC、術前検査および問診の上、組織採取および採血を実施。
症例 10	1 yr 1 mo / 男性	IC、術前検査および問診の上、組織採取および採血を実施。

皮膚組織受け入れ時に採取した組織の一部は NAT 用検体として J-TEC で凍結保管し、東京医科歯科大学に送付して検査した。ウイルス検査 (NAT) は、東京医科歯科大学で開発したマルチプレックス PCR 法によるウイルス多項目同時測定にて行った。これは、各ウイルス検出用のプライマー・プローブが固相化されたリアルタイム PCR 反应用チューブに、反応液および検体を混合して RT-qPCR を実施する方法である (図 2)。ウイルス検査は、最初にマルチプレックス PCR 法にて定性的に検査し、陽性と判定された場合には、同じ検体を用いて定量的な検査を実施して、検出感度以上であれば陽性と判定した。

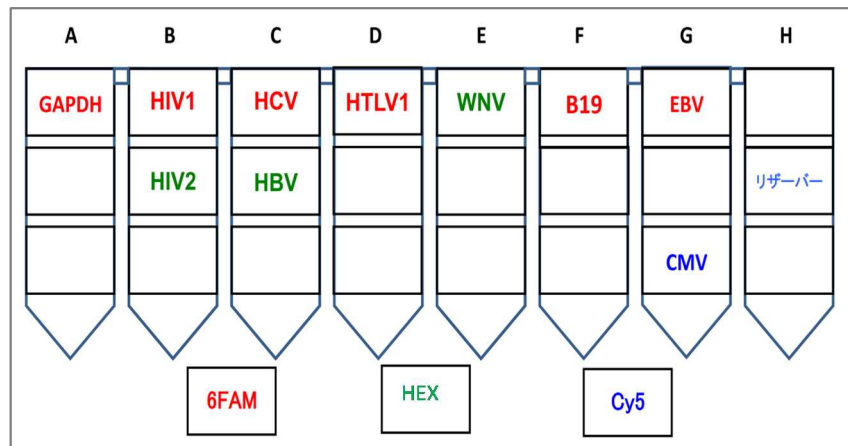


図2 リアルタイム PCR 反应用チューブへのウイルス配置

文書整備等の体制構築

2016年7月に実施した薬事戦略相談対面助言におけるPMDAとの合意に従い、ドナーに対してウインドウピリオドを勘案した再検査を実施することについて京都大学倫理委員会に再承認を得るために、倫理委員会申請書、問診票、同意説明文書等の京都大学における文書整備、およびウイルス検査会社の対応を含む実施体制を構築した。

京都大学倫理委員会に修正申請を行い、2016年8月2日に再承認を受けた。倫理委員会申請書には、①余剰皮膚より採取するため、採取に伴う負担は生じない、②皮膚組織の提供は本人もしくは代諾者の自由意思に基づくものであり、提供に同意していただけない場合でも、治療に際してドナーが不利益を受けることはない、③提供に同意した後でも、同意を撤回できる期間を設ける、④連結可能匿名化して個人情報管理する、等を明記した。また、手術前に本人もしくは代諾者に研究内容を十分に説明するための同意説明文書と文書による同意を得るための同意書、およびドナー適格性確認のための問診票を作成した。

東京医科歯科大学にて実施するウイルス検査については、信頼性基準を満たすための体制を整備した。具体的には、ウイルス検査を「申請資料の信頼性の基準」に基づいて実施する方法についてJ-TECと協議し、協議書を作成した。

検査に係る文書（機器操作手順書、機器使用記録、定期保守点検記録、試験操作手順書等）を整備して運用を開始した。また、検査担当者に対して信頼性基準に関する研修を行った。

ヒト組織採取体制の検証/評価

同種細胞を用いた製品開発や商業利用に関する社会の認知、同意取得、仲介機関の必要性、医療機関の負担、提供の負担、契約関係等について、ICや組織採取の実務を通して得られた情報を、担当医がJ-TEC作成のアンケートに回答する形式でまとめた（表3）。

ドナー（代諾者）10例の組織提供に対する印象は、積極的・好意的なドナーが2例、抵抗を示さ

なかったドナーが 5 例と、提供が滞りなく進んだドナーが過半数を占めた。一方、残りのドナー3 例、および同意に至らなかったドナー1 例は、何れも再採血に対する抵抗を示したことから、再採血はドナー負担が最も大きい項目であることが判明した。本研究では、担当医の実務が、IC、文書管理、組織の受け渡し、再採血の采配、データ管理等、多岐に渡り負担が多かった。また、担当医による IC がドナーの自由意志に影響する可能性も懸念され、第三者のコーディネーターが行うことが望ましい。ただ、コーディネーターは、研究全体の理解が必要不可欠であり、教育期間や雇用が必要であることから、今回は導入できなかった。本研究を通して、コーディネーターの育成や雇用状態等多くの課題が明らかとなった。

情報管理体制については、IC を得たドナーを匿名化するために J-TEC が指定したユニークな症例コードを付与して管理した。ドナー患者の年齢と性別、原疾患情報、および感染症検査の結果以外は J-TEC および東京医科歯科大学に開示せず、京都大学で匿名加工情報とした。ドナーと細胞ストックの識別番号との紐付け（対応表）は京都大学のみが確認できるものとし、専用の外付けハードディスク内に電子媒体として保存して鍵のかかる保管庫で管理している。

品質管理については、J-TEC 内に皮膚組織を受け入れる際に、自家培養表皮ジェイス®と同様の受入検査を設定し、適切な採取・運搬がされていることを確認した。また、京都大学にて実施される術前検査および問診結果の受領体制、および検査会社に委託される組織採取時の血清学的試験結果の受領体制等を評価するとともに、結果受領のフローを作成して体制を強化した。

表 3 J-TEC 作成の実務アンケートに対する回答

1. 今回「同種細胞ソースの確保」に関し、ご担当された業務をご記入ください。

また特にご負担が大きかった業務や、今後改善を希望される業務がございましたらご教示ください。

(複数回答可)

【担当業務】

- ①ウイルス検査に関する PMDA との相談対応
- ②患者説明・同意文書、問診票の作成
- ③倫理委員会申請（研究実施計画書の作成等）
- ④保険会社、ウイルス試験会社との契約
- ⑤組織採取時の IC
- ⑥皮膚・血液採取
- ⑦採取した血液の遠心分離、試験会社への受け渡し
- ⑧採取した皮膚の梱包、J-TEC への発送
- ⑨ウイルス検査結果の患者説明用資料作成
- ⑩再採血
- ⑪研究協力金支払い手続き

【負担の大きかった業務・改善を希望する業務】

- ⑤組織採取時の IC

→最も負担が大きい。

手術前日に行われる執刀医からの術前説明に引き続いて、研究についての説明を行った。

患者側からすると、手術のことで頭がいっぱいのところに関係のない話を聞かされるわけであり、落ち着いて自発的な意思で回答できる理想的な状態ではなく、返答までの時間的余裕も与えられない。理想的には研究への参加を自由意思で落ち着いて判断できる環境が望まれる。本来であれば第三者のコーディネーターなどが対応すべき事柄であるが、手術を行う施設の医師が行うことで断りにくい状況を生み出している可能性はある。

本研究開始直後には同意が得られない症例もあり、スムーズな同意が得られにくい状況であったが、症例を重ねるにつれ、特に後半においてはほぼ全例の同意をスムーズに得ることができた。これは説明医の熟練（説明の仕方がうまくなった）ことが大きく、IC の際の誘導方法に大きく依存することがわかる。

患者が参加を判断する根拠となる情報は、この状態では説明医から与えられた情報を用いて判断するしかない状態であり、情報の与え方によって恣意的である。

- ⑥皮膚・血液採取

→術中の血液採取は全身麻酔下であるため患者の苦痛はないものの、手術時間枠の制限がある中で行うため、スムーズに採取できなかった場合の周囲スタッフに与える影響が大きい。

- ⑩再採血

→患者に最も負担がかかる項目であり、細かな配慮を要する。幼少児からすみやかに採血できる技術スタッフが必要。術後観察の目的での外来受診時に、診察後に採血を行った。全例、拒否的ではなくスムーズに行うことができた。押さえつけて小児科医により基本的には手背の静脈から計 8ml の採血を行うが、10～30 分で行うことができ、最低 6ml の採血ができた。特に副損傷などを生じなかった。

2. 組織提供の同意を得る際、ドナー（代諾者）の積極性等の印象はいかがでしたでしょうか。

下記項目について大よその割合をご記入ください。

【選択項目】	・興味を持ち組織提供に積極的なドナー	20%
	・抵抗はない程度のドナー	50%
	・やや抵抗感のあるドナー	30%
	（実害がないため協力いただいた）	
	・その他	%（内容：）

3. また、今回2例の同意が得られませんでした。患者様が抵抗を示された部分はどの辺りでしょうか。

○でご選択ください。（複数回答可）

- ・用途（商業利用について）
- ・用途（培養・増殖させることについて）
- ・第三者（企業）への提供
- ・個人情報管理の懸念
- ・採血量の増加
- ・○**再採血**
- ・再採血のための来院
- ・同意書署名や問診の手間
- ・何らかのリスクが増加するような不安
- ・○**よく理解ができない**
- ・全く興味がない

遺伝情報の流出について懸念（質問）があったのは1例のみ。多くの保護者は、細胞の提供、その後の使用、実際の製品に使われること、個人情報流出の懸念、などに不安を示すことはなかった。

ネックは再採血のみ。術前スクリーニングの際の採血で時間がかかったとか、採血した日の夜泣いて寝なかったなどの経験があった場合、採血に対する抵抗感が強く、それを嫌がる例が多かった。

4. 今回仲介機関を介さず、直接先生に同意を取って頂きました。その点について、（同意説明など）苦勞された点や工夫された点、その他ご意見等ございましたらご教示ください。

本研究の主旨や、具体的に行われる内容（提供された皮膚にどのような操作を行って、どう管理しているのか）など、製品の研究がどこまですすんでいるのか、iPS細胞との違い、など、不安からではなく興味本位でいろいろと質問してくる方がおり、IC担当者は研究全体を理解していないとまずいだろうと思う。このため、一人の担当医が説明するしかない状況であったため、ICも再採血も全例担当医一人が対応した。これをコーディネーターに依頼する場合には、コーディネーターの研究に対する理解度が重要になる。

5. 今回は約1カ月に1例の頻度で、全10例採取頂きました。

例数設計や頻度に対するご負担はいかがでしたでしょうか。○でご選択ください。

- 【例数】
- ・多すぎる
 - ・やや多い
 - ・○**ちょうどよい**
 - ・もう少し多くてもよい
 - ・もっと多くてもよい
- 【頻度】
- ・高すぎる
 - ・やや高い
 - ・○**ちょうどよい**
 - ・もう少し高くてもよい
 - ・もっと高くてもよい

研究としては必要数でありよかったと思うが、臨床医としては4.に記載のとおり負担が大きかった。

6. 産学連携でプロジェクトを進めるにあたり、苦勞された点や工夫された点、その他ご意見等ございましたらご教示ください。

前述の通り、理想的にはコーディネーターがIC、文書管理、組織の受け渡し、再採血の采配、データ管理を担ってくれることが理想ではあるが、そのコーディネーターの育成をどうするか、雇用状態をどうするかなど多くの問題点がある。

7. 今後同様のプロジェクトがあった場合、再度ご協力いただけますでしょうか。

○でご選択ください。

- ・○**協力したい**
- ・負担が減れば協力したい
- ・断る
- ・わからない（内容による）
- ・その他（ ）

8. その他、当該事業全体についてご意見ございましたらご記入ください。

（記載なし）

2) 商業用セルバンクの構築

表皮細胞・線維芽細胞の特性解析

商業用セルバンクの構築にあたり、表皮細胞と線維芽細胞の特性を把握するとともに品質の幅を推定する目的で、研究用の皮膚組織から分離・培養した細胞の特性解析を実施した。

なお、受け入れた皮膚組織は匿名化し、症例コードを付与して情報管理した。

I) 表皮細胞の特性解析

京都大学より受け入れた研究用の皮膚組織を用いて、表皮細胞を分離・培養し、表皮細胞の特性解析として、NATによるウイルス検査、細胞増殖能、サイトカイン産生能、および核型解析と遺伝学的安定性に関する検討を行った。

i) NATによるウイルス検査

予備的に受け入れた研究用皮膚組織について、組織採取時の患者血液（血漿および血球）、皮膚組織、および培養して作製した凍結セルストック（表皮細胞および線維芽細胞）に対して、NATによるウイルス検査を実施した（表4）。ウイルス種は、レトロウイルスとして、ヒト免疫不全ウイルス1型（HIV1）、ヒト免疫不全ウイルス2型（HIV2）、ヒトT細胞白血病ウイルス1型（HTLV1）およびヒトT細胞白血病ウイルス2型（HTLV2）の4種、DNAウイルスとして、HBV、EBV、CMV、PV B19、単純ヘルペスウイルス1型（HSV1）、単純ヘルペスウイルス2型（HSV2）、水痘・帯状疱疹ウイルス（VZV）、ヒトヘルペスウイルス6型（HHV6）、ヒトヘルペスウイルス7型（HHV7）、ヒトヘルペスウイルス8型（HHV8）、アデノウイルス（ADV）、ヒトポリオーマウイルス（JCV）、ヒトポリオーマウイルス（BKV）およびヒトパピローマウイルス（HPV）の14種、RNAウイルスとしてHCV、およびマイコプラズマ（MP）を検査項目とした。

その結果、9症例のうち、4症例の患者血液や皮膚組織でCMV、PB19、HHV7およびADV陽性であった。しかし、培養細胞の凍結セルストックでは、全症例で全ウイルス種が陰性であった。

表 4 NAT によるウイルス検査結果

症例	A			B			C			D			E			F			G			H			I		
年齢/性	10 mo / 男			1yr 9mo / 男			3 mo / 男			5 mo / 女			71 yr / 男			2 yr / 女			59 yr / 女			3 mo / 男			50 yr / 女		
項 目	血液	皮膚組織	線維芽細胞	血液	皮膚組織	線維芽細胞	血液	皮膚組織	線維芽細胞	血液	皮膚組織	線維芽細胞	血液	皮膚組織	線維芽細胞	血液	皮膚組織	線維芽細胞	血液	皮膚組織	線維芽細胞	血液	皮膚組織	線維芽細胞	血液	皮膚組織	線維芽細胞
HIV1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HIV2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HTLV1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HTLV2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HBV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HCV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CMV	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
EBV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PV B19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HSV1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HSV2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
VZV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HHV6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HHV7	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HHV8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ADV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
JCV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
BKV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HPV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

- : 陰性、+ : 陽性

ii) 細胞増殖能

予備的に受け入れた研究用皮膚組織から分離したヒト表皮細胞の増殖経過について、症例間差および継代加算による影響を確認ために、5 継代目まで継代培養した (図 3)。その結果、症例毎に増殖速度の違いが認められたが、全ての症例において 5 継代まで増殖速度は低下しないことを確認した。一方、継代毎に、播種細胞数に対するコロニー形成の能力をもつ細胞の割合を評価するコロニー形成能試験では、継代加算によりコロニー形成能が低下する傾向が認められた。

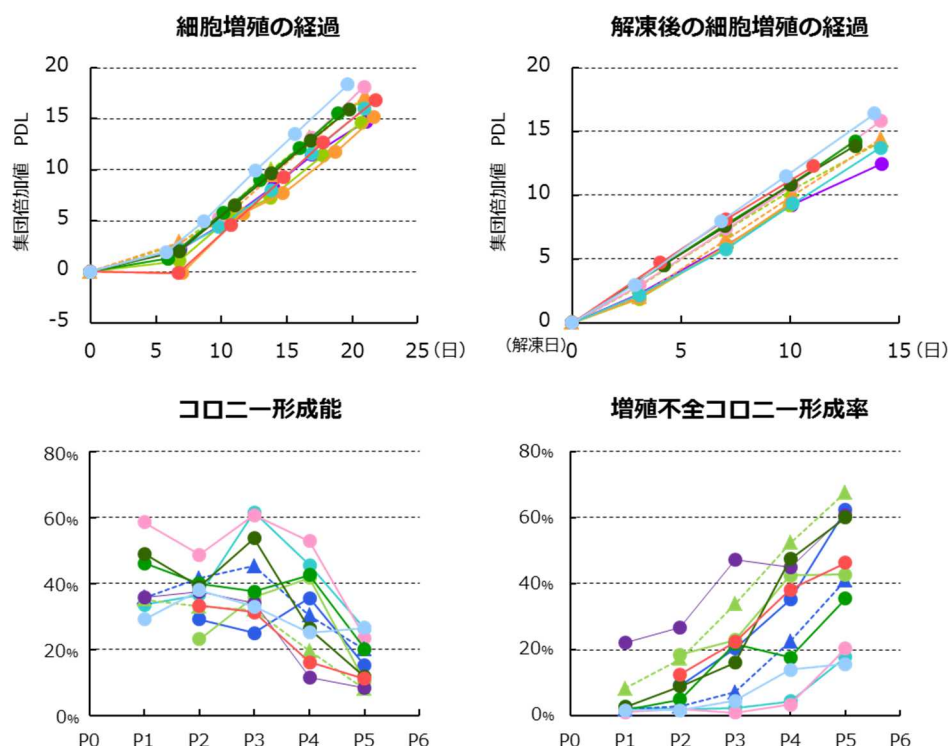


図 3 ヒト表皮細胞の増殖経過

iii) サイトカイン産生能

予備的に受け入れた研究用皮膚組織から分離・培養したヒト表皮細胞が産生するサイトカインについてサイトカインアレイを用いて網羅的に解析した。5 継代目に相当するヒト表皮細胞を用いて培養表皮を作製した際の培養上清を検体とし、各ガラスアレイにスポットしてある 120 種類のサイトカイン特異抗体に反応した蛍光像をスキャンした画像を解析した。対照として用いる表皮細胞培養用培地より 1.5 倍以上のシグナル強度を示す場合に、該当するサイトカインが産生されたと判断した。

その結果、ヒト表皮細胞から 44 種類のサイトカインが産生されていることを確認した (表 5)。そのうち対照培地と比較したシグナル強度が高い上位 20 種のサイトカインの作用を調査したところ、創傷治癒への関与が示唆されるサイトカインの産生が示唆された (表 6)。

表 5 ヒト表皮細胞が産生するサイトカイン

症例	B	C	D	E	F	G	I
年齢	1 yr 9 mo	3 mo	5 mo	71 yr	2 yr	59 ry	50 yr
サイトカイン*	倍率 (/対照)						
Angiogenin	273.0	257.9	207.7	266.5	263.8	261.5	255.5
MIP-3 alpha	53.5	28.7	104.0	108.9	133.7	99.1	123.2
TIMP-2	75.9	59.3	52.5	48.1	35.3	32.2	51.0
TIMP-1	50.5	32.7	28.8	71.9	68.3	70.0	67.4
RANTES	33.0	9.2	18.5	35.0	14.3	31.4	70.8
IGFBP-2	33.5	36.4	39.5	31.1	19.2	5.7	5.9
Amphiregulin	6.5	6.4	13.2	31.2	38.2	16.7	36.1
IL-8	15.7	14.8	33.3	37.0	35.6	26.1	35.1
GRO	33.7	32.9	35.2	35.8	34.1	32.8	33.4
VEGF-A	35.7	28.5	25.4	33.0	21.6	23.7	16.6
Leptin	3.5	7.1	5.6	16.7	7.3	4.4	4.9
PLGF	7.2	5.7	5.6	16.4	7.7	7.9	8.0
MIF	2.9	11.3	2.8	1.4	1.6	1.9	2.0
TNF R1	3.6	2.3	5.1	7.9	9.7	7.2	8.5
IL-6 R	7.4	4.1	2.2	9.0	4.0	5.8	4.9
EGFR	4.5	5.7	8.4	4.9	6.8	4.3	4.7
beta-NGF	7.1	5.4	4.0	4.1	4.2	4.9	4.1
IGFBP-6	3.2	2.0	3.8	6.8	4.4	2.4	3.0
uPAR	3.2	2.5	6.7	1.9	1.7	1.8	1.8
ENA-78	1.2	1.0	2.2	6.0	2.9	1.0	1.5
FGF-9	3.1	2.4	2.4	2.1	2.1	2.3	2.1
Osteoprotegerin	1.4	1.1	3.0	2.8	2.8	1.8	2.2
Fractalkine	3.0	1.1	1.1	1.1	0.9	1.0	1.0
IL-1ra	1.9	2.8	1.4	1.3	1.2	1.2	1.2
CCL28	0.9	1.2	0.9	2.6	1.1	1.7	2.3
HGF	1.6	1.2	1.6	2.5	0.9	1.2	1.2
HCC-4	1.0	1.2	0.9	2.3	1.0	1.2	1.3
Adiponectin	2.2	1.5	2.1	1.8	1.6	2.0	1.3
CTACK	1.0	0.9	1.2	0.9	1.2	1.8	2.2
Eotaxin-2	2.0	1.7	1.5	1.8	1.3	1.8	1.8
GRO alpha	1.0	1.1	1.1	2.0	1.3	1.6	1.3
gp130	1.7	1.4	1.8	1.9	1.5	1.6	1.9
PDGF-BB	1.0	1.2	1.6	1.3	1.9	1.0	1.3
MIP-1 delta	1.1	1.3	0.8	1.1	1.0	1.2	1.9
CK beta 8-1	1.6	1.3	1.7	1.8	1.7	1.5	1.8
IL-2 R alpha	1.0	0.9	1.0	1.7	1.0	1.1	1.2
IL-1 alpha	1.0	1.6	0.8	1.0	0.9	1.0	1.1
BMP-4	0.9	1.2	1.6	1.3	1.2	1.2	1.2
IL-11	1.2	1.5	1.1	1.5	1.4	1.3	1.6
bFGF	1.6	1.1	1.4	0.9	1.4	1.2	1.1
IL-12 p70	1.6	1.2	1.2	1.3	1.1	1.1	1.2
IL-1 R4	1.4	1.6	1.4	1.4	1.4	1.3	1.3
MCP-3	1.6	1.1	1.2	1.3	1.2	1.3	1.2
MDC	1.2	1.3	1.2	1.1	1.3	1.3	1.5

* : 対照培地の 1.5 倍強シグナルのサイトカインを記載。

網掛 : 最大値の 70%強度

表 6 ヒト表皮細胞において産生が確認されたサイトカインの効果

強度順	サイトカイン	作 用
1	Angiogenin	血管新生促進
2	MIP-3 alpha	IL-8 と同じような挙動、熱傷の滲出液で増加
3	TIMP-2	線維芽細胞に電気刺激を与えると増加
4	TIMP-1	血管新生
5	RANTES	ケラチノサイト、リンパ球、内皮細胞の活性促進
6	IGFBP-2	血管新生促進、表皮前駆細胞と表皮細胞との結合に必要
7	Amphiregulin	ケラチノサイト産生
8	IL-8	好中球の遊走促進、血管新生促進
9	GRO	GRO alpha は血管新生促進、GRO beta は好中球、単核球の活性促進
10	VEGF-A	血管内皮細胞の増殖、血管新生促進
11	Leptin	皮膚の創傷治癒促進、ケラチノサイトの遊走・増殖促進
12	PLGF	血管新生促進
13	MIF	腫瘍形成促進、血管新生促進
14	TNF R1	TNF alpha（好中球遊走促進）の作用を低減の可能性
15	IL-6 R	血管新生促進（VEGF 産生促進）、MCP-1 の産生促進
16	EGFR	表皮細胞の増殖促進
17	beta-NGF	再上皮化促進
18	IGFBP-6	がん細胞や横紋筋肉腫では血管新生促進、がん細胞の増殖阻害
19	uPAR	血管新生促進、TGF beta の発現促進
20	ENA-78	好中球とリンパ球の活性化

iv) 核型解析と遺伝学的安定性

皮膚採取のドナーとしては、治療として外科的な切除手術が行われる多指症や副耳等の乳幼児患者を想定している。これらの疾患の発症は、多くの場合単一遺伝子の変異ではなく、発生過程におけるシグナル異常が原因と考えられているが、これまでに多指症や副耳を切除した皮膚由来の細胞について染色体分析された報告はない。そこで、これらの患者由来細胞を使用する妥当性を判断する目的で、多指症患者由来の表皮細胞 3 症例について、各症例の 1 継代、および 5 ないし 10 継代に相当する表皮細胞に対して、G-band 分染法による核型分析を実施した。

その結果、1 歳 3 ヶ月齢の 1 例において、1 継代の 14 細胞中 1 細胞に 3 番染色体短腕の部分欠失、15 番染色体喪失およびマーカー染色体の増加が認められ、1 細胞に 5 番染色体の長腕末端および 11 番染色体の長腕の一部に相互転座が認められた。また、同一例の 5 継代の 17 細胞中 1 細胞に 4 番染色体の短腕末端に由来不明の染色体領域の付加、および 10 番染色体の長腕の部分欠失が認められたが、10 継代の 20 細胞の分裂像ではモダル数は正常本数であり、特徴的な構造異常は認められなかつ

た。残りの2例の核型分析では、1継代および5継代の細胞において核型異常は確認されなかった。

以上のことから、多指症に共通の染色体異常は確認されず、同種セルバンクのドナーとしての適格性は、核型分析試験によりスクリーニング可能であることが示唆された。

II) 線維芽細胞の特性解析

ヒト線維芽細胞の特性解析として、研究用の皮膚組織を用いた線維芽細胞の培地の評価、細胞の分化度による分類と血管新生誘導能評価、サイトカイン産生能とコラーゲン遺伝子の発現について検討した。

i) 培地の評価

ヒト線維芽細胞の培養において、標準的に汎用される10%ウシ胎児血清含有培地、市販の線維芽細胞専用培地、および当社で開発した低血清線維芽細胞分化培地を用いて細胞特性に与える影響を評価した結果、10%ウシ胎児血清含有培地と比較して、市販の線維芽細胞専用培地の細胞増殖能は著しく高く、低血清線維芽細胞分化培地では細胞増殖能は低かった(図4)。

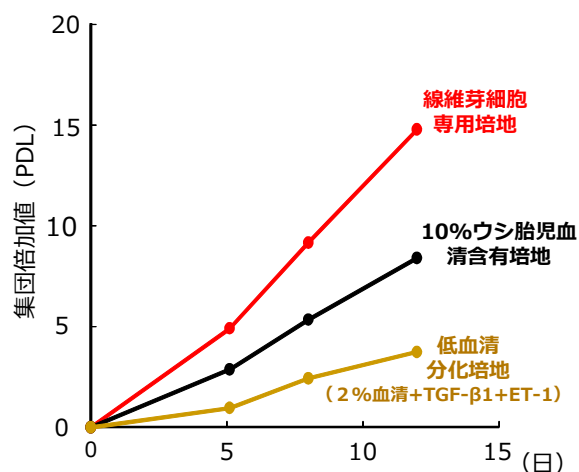


図4 培地によるヒト線維芽細胞の増殖比較

ii) 細胞の分化度による分類と血管新生誘導能評価

10%ウシ胎児血清含有培地、市販の線維芽細胞専用培地、および低血清線維芽細胞分化培地を用いて培養したヒト線維芽細胞を、細胞骨格の発達度合によって分類すると、線維芽細胞専用培地を用いて培養した線維芽細胞は細胞骨格が「未成熟」な細胞型を示したのに対し、低血清線維芽細胞分化培地を用いて培養した線維芽細胞は細胞骨格が発達した「分化型」の細胞型、10%ウシ胎児血清含有培地を用いて培養した線維芽細胞は「中間型」の細胞型を示した(図5)。さらに、それぞれの線維芽細胞を血管内皮細胞と共培養して評価する血管新生誘導能評価を行ったその結果、市販の線維芽細胞専用培地を用いた未成熟型の線維芽細胞のみが血管新生誘導能を有していた(図5)。

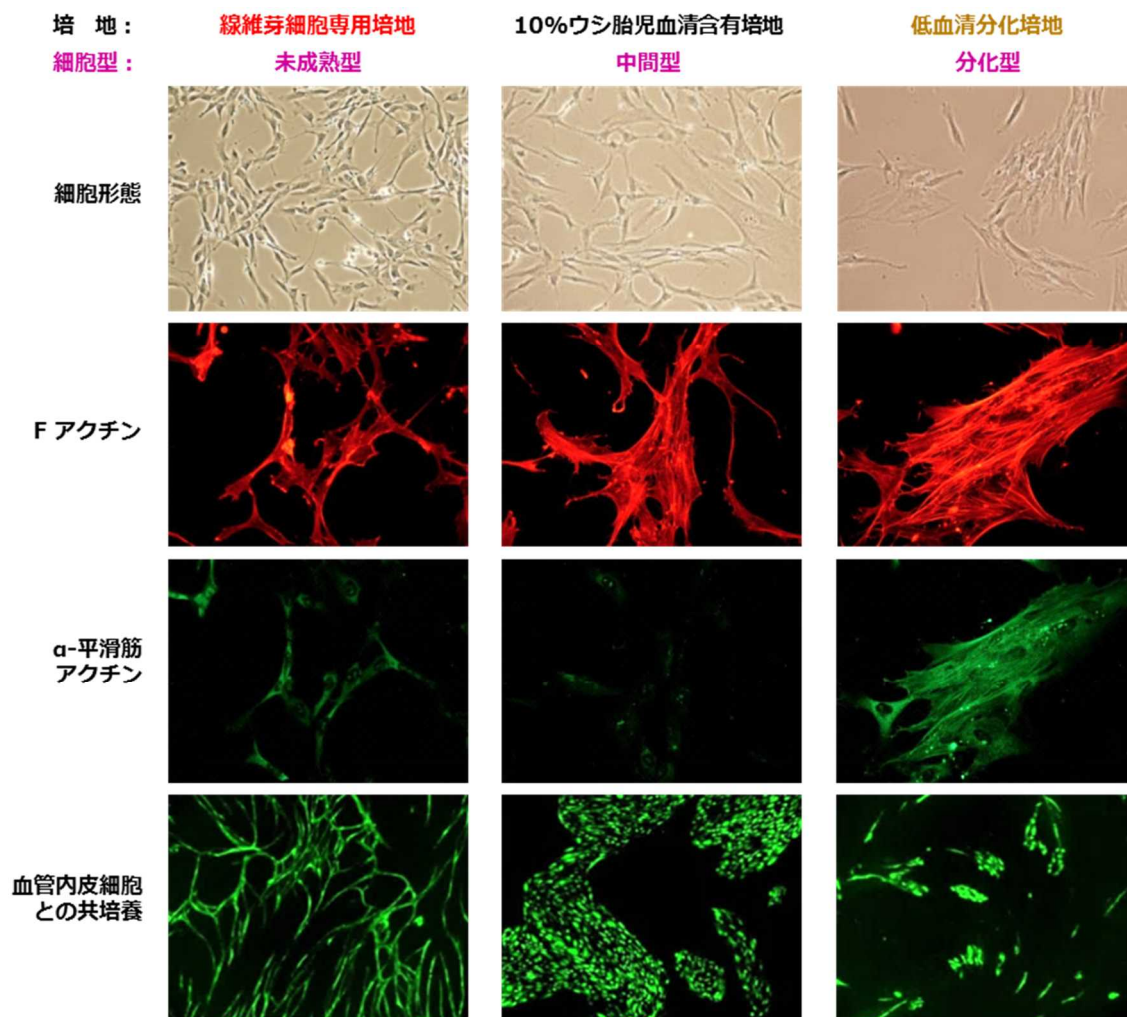


図 5 ヒト線維芽細胞の特性評価

次に、未成熟型線維芽細胞が有する血管新生誘導能の作用機序を明らかにするため、培養上清中に含まれるサイトカイン因子をサイトカインアレイによって評価した結果、未成熟型線維芽細胞は中間型線維芽細胞と比較して、血管新生や創傷治癒に関連する因子として報告されている HGF、IL-8、IL-10 の産生が高いことを確認した（図 6）。さらに、血管新生誘導能評価試験においてサイトカイン抗体を処理した結果、ある抗体が未成熟型線維芽細胞が有する血管新生誘導能を阻害し、ある抗体は影響を与えないことを見出した。

これらのことから、未成熟型線維芽細胞は、特定のサイトカインの産生を介して高い血管新生誘導能を発揮していることが示唆された。



図 6 ヒト線維芽細胞培養上清を用いたサイトカインアレイ
(赤色：未成熟型の産生量が多い、緑色：中間型の産生量が多い、黄色：両型の産生量が同程度)

iii) サイトカイン産生能とコラーゲン遺伝子の発現

未成熟型、中間型および分化型の線維芽細胞におけるサイトカインの産生、およびコラーゲン遺伝子の mRNA 発現量を、ELISA 法および qRT-PCR 法により比較した。その結果、未成熟型の線維芽細胞では特定のサイトカインの産生量が高く (data not shown)、コラーゲン遺伝子の mRNA 発現量が低かったことから (図 7)、未成熟型の細胞特性の指標となることが示唆された。

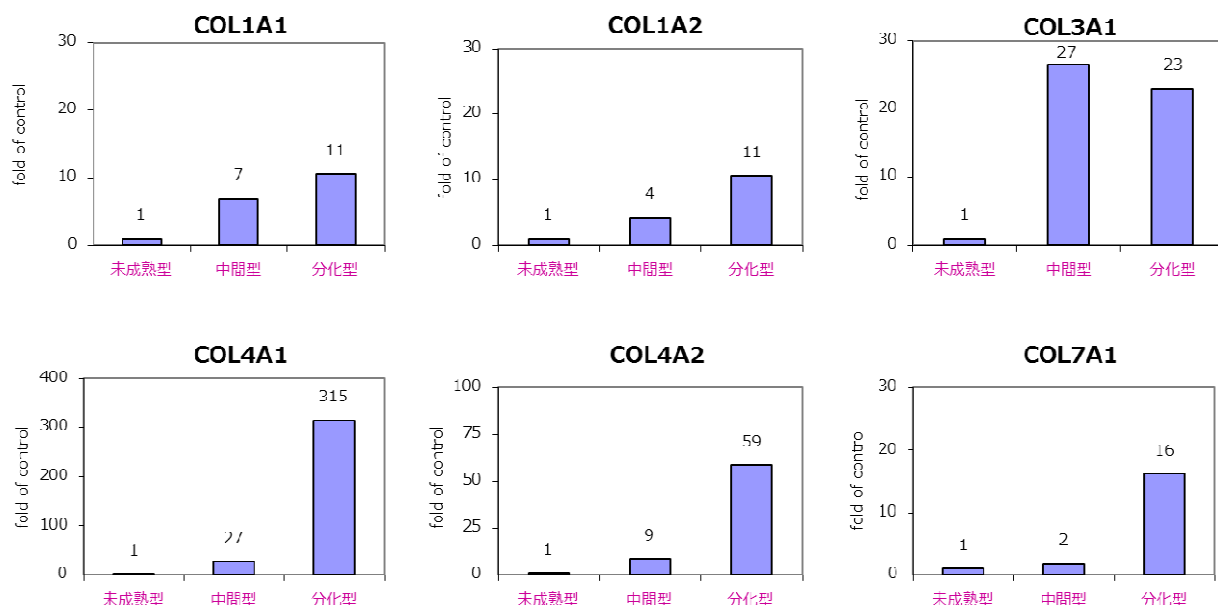


図 7 qRT-PCR 法によるヒト線維芽細胞のコラーゲン mRNA 発現量解析

表皮細胞・線維芽細胞のストック作製

京都大学にて IC が得られた 10 例のドナーから採取した皮膚組織より表皮細胞および線維芽細胞の分離を行い、表皮細胞は 3T3-J2 細胞のフィーダー法で培養を行い、線維芽細胞は外植法にて遊走細胞を培養した。表皮細胞は 1 継代、線維芽細胞は 2 継代に相当する細胞をそれぞれ回収し、何れも相当数のセルストックを作製して凍結保存することができた（表 7）。

表皮細胞の増殖は、ジェイス®の製造工程と同等もしくは同等以上の順調な経過を示した。何れの細胞も、培養 2～4 日目にコロニーが確認され、サブコンフルエントに達した培養 7～9 日目に細胞を回収して凍結セルストックを作製することができた（図 8）。また、組織処理時およびセルストック作製時に得られる細胞を用いてコロニー形成能を評価した（図 9）。その結果、セルストック本数が少数であった 2 例（症例 5、症例 8）の組織処理時の増殖不全コロニー含有率（形成されたコロニー中の増殖不全コロニーの割合）は、他の検体と比べて高値を示した。一方、セルストック作製時のコロニー形成率（形成されたコロニー数 / フラスコに播種した細胞数）は全例良好であった。

線維芽細胞は、培養 2 週間以内に細胞の遊走を確認し、培養 3～4 週間目に継代した後、4 日間の培養を経て細胞を回収して凍結セルストックを作製することができた（表 9、図 10）。

表 7 表皮細胞および線維芽細胞のセルストックの作製

症例	年齢 / 性別	皮膚面積	表皮細胞 ストック	線維芽細胞 ストック
症例 1	1 yr 0 mo / 男性	2.8 cm ²	1 継代 : 33 本	2 継代 : 32 本
症例 2	1 yr 10 mo / 男性	2.8 cm ²	1 継代 : 62 本	2 継代 : 13 本
症例 3	1 yr 1 mo / 女性	1.3 cm ²	1 継代 : 6 本	2 継代 : 71 本
症例 4	3 mo / 男性	0.8 cm ²	1 継代 : 9 本	2 継代 : 60 本
症例 5	1 yr 4 mo / 女性	2.3 cm ²	1 継代 : 5 本	2 継代 : 19 本
症例 6	1 yr 1 mo / 男性	3.8 cm ²	1 継代 : 36 本	2 継代 : 42 本
症例 7	1 yr 2 mo / 男性	5.8 cm ²	1 継代 : 26 本	2 継代 : 26 本
症例 8	1 yr 2 mo / 男性	0.5 cm ²	1 継代 : 5 本	2 継代 : 55 本
症例 9	1 yr 7 mo / 男性	3.0 cm ²	1 継代 : 14 本	2 継代 : 72 本
症例 10	1 yr 1 mo / 男性	3.0 cm ²	1 継代 : 22 本	2 継代 : 64 本

表 8-1 表皮細胞増殖経過の顕微鏡観察像

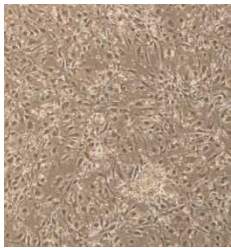
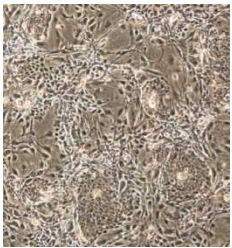
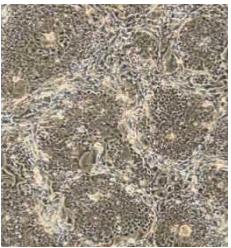
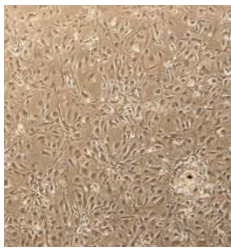
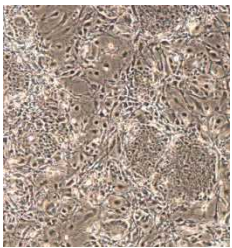
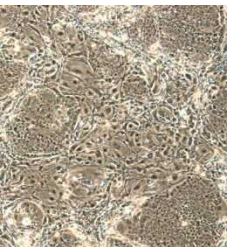
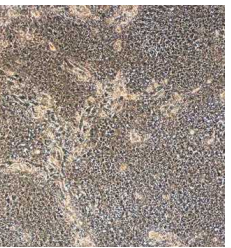
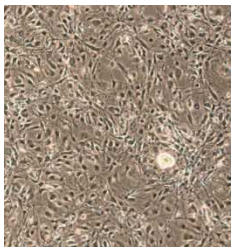
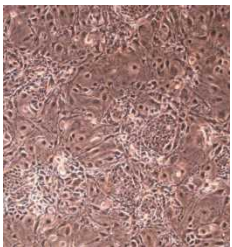
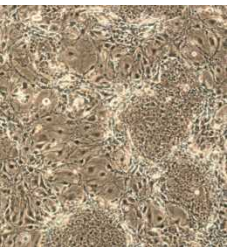
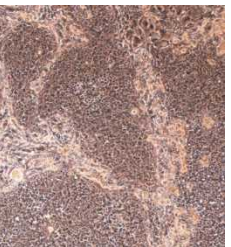
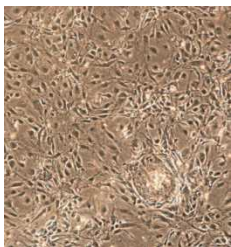
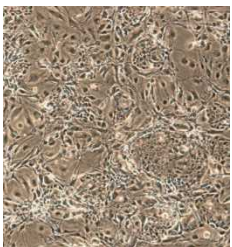
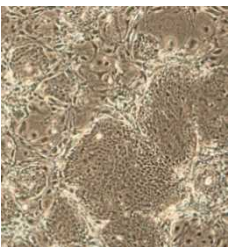
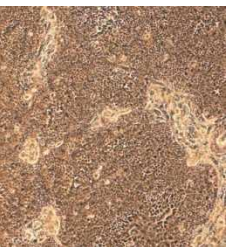
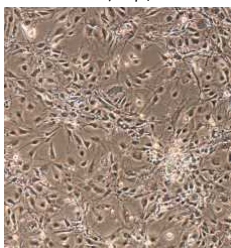
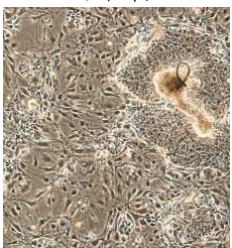
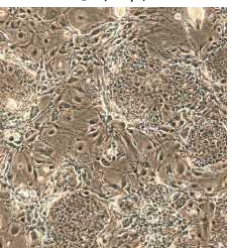
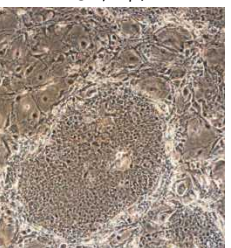
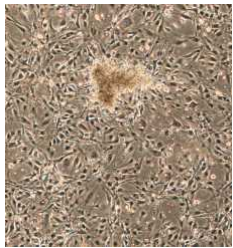
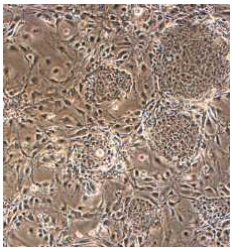
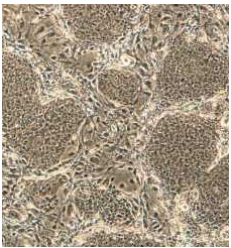
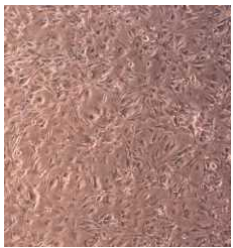
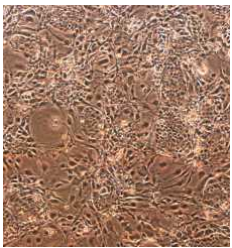
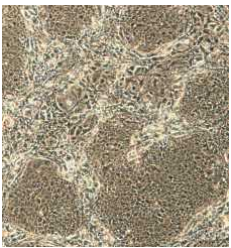
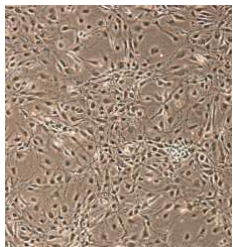
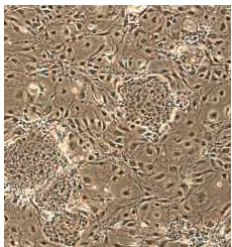
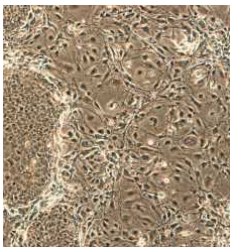
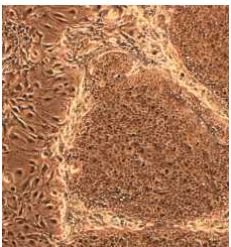
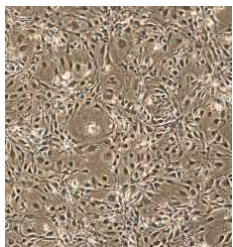
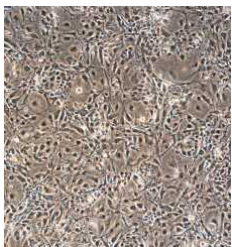
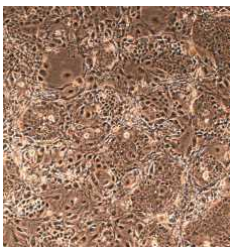
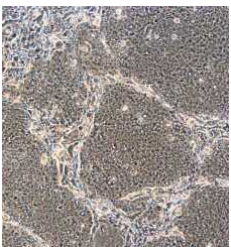
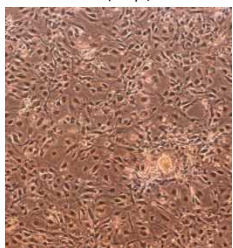
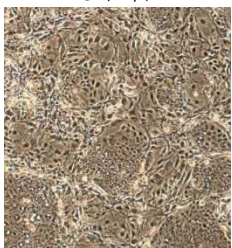
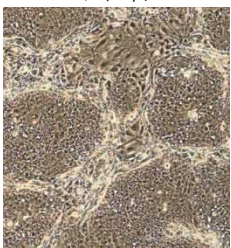
症例	初 代 培 養 経 過 (対物 4 倍)			
症例 1	2 日目	5 日目	6 日目	7 日目
				
症例 2	2 日目	6 日目	7 日目	8 日目
				
症例 3	3 日目	6 日目	7 日目	8 日目
				
症例 4	3 日目	5 日目	6 日目	7 日目
				
症例 5	4 日目	7 日目	8 日目	9 日目
				

表 8-2 表皮細胞増殖経過の顕微鏡観察像

症例	初 代 培 養 経 過 (対物 4 倍)			
症例 6	2 日目	7 日目	8 日目	9 日目
				
症例 7	4 日目	6 日目	7 日目	8 日目
				
症例 8	4 日目	7 日目	8 日目	9 日目
				
症例 9	4 日目	5 日目	6 日目	7 日目
				
症例 10	2 日目	6 日目	7 日目	8 日目
				

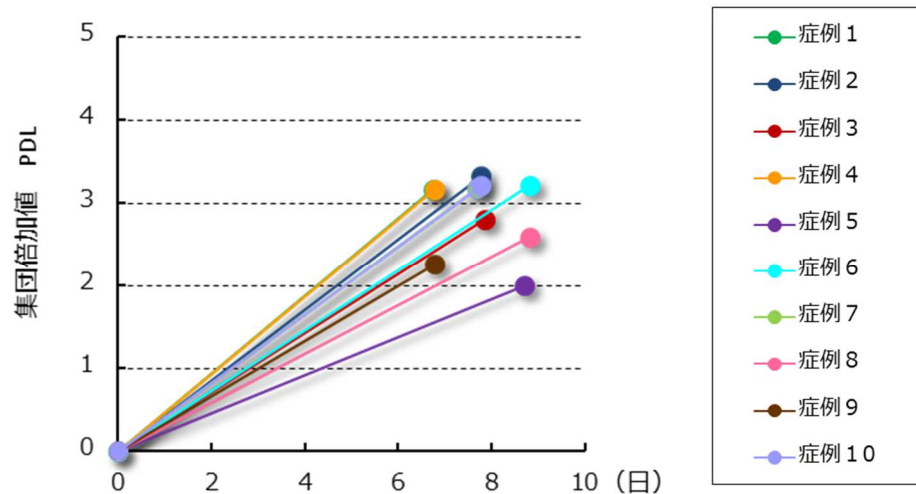


図 8 セルストック作製までの表皮細胞の増殖比較

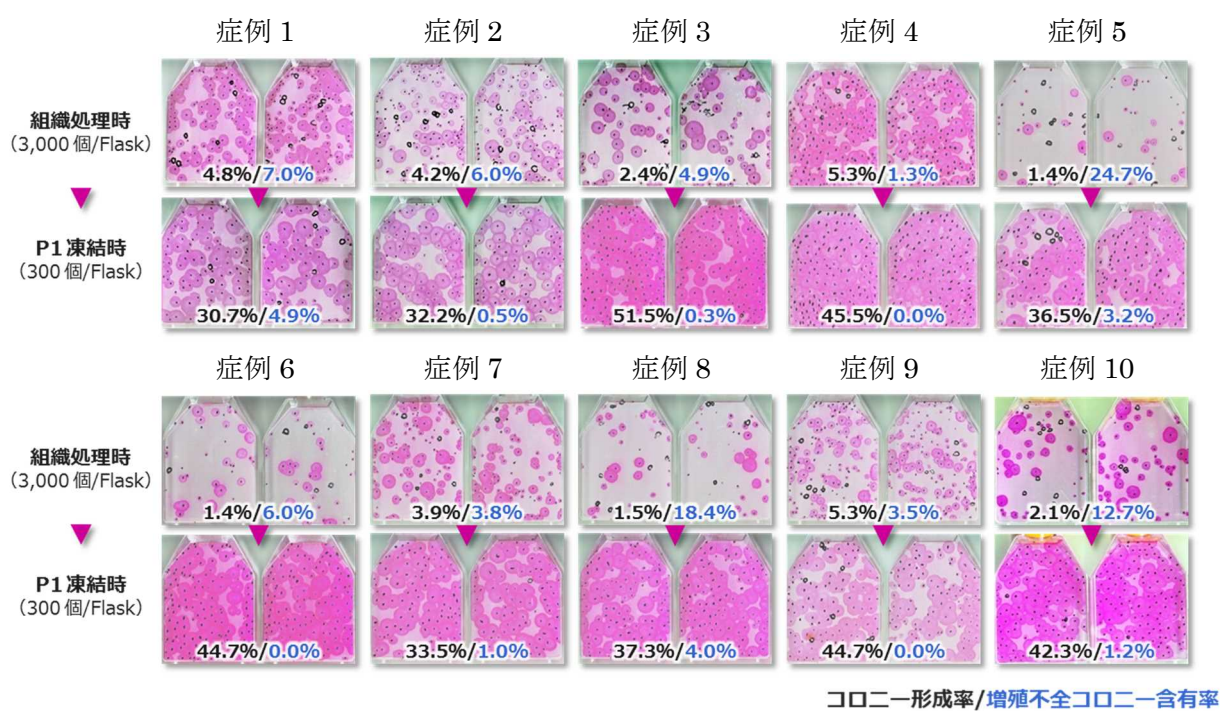


図 9 表皮細胞の細胞増殖能

表 9-1 線維芽細胞増殖経過の顕微鏡観察像

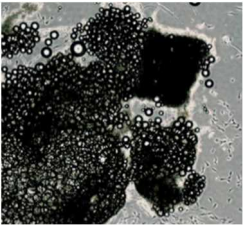
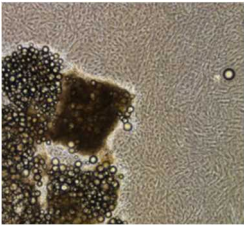
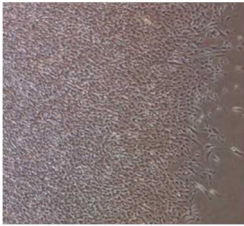
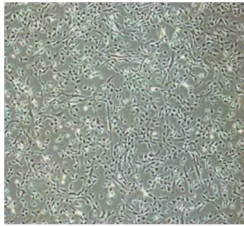
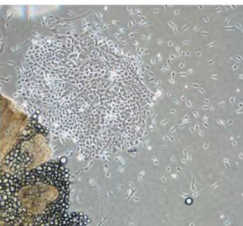
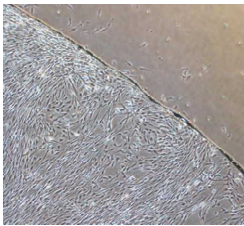
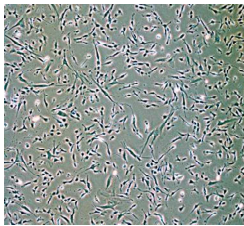
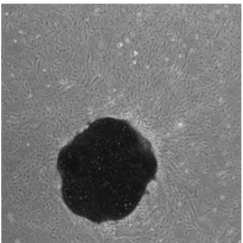
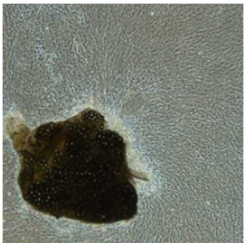
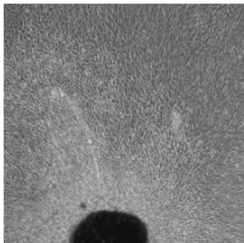
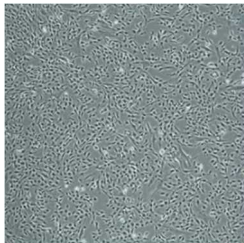
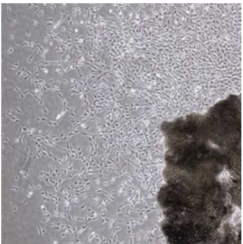
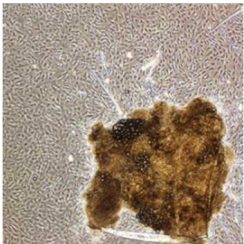
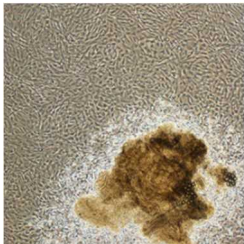
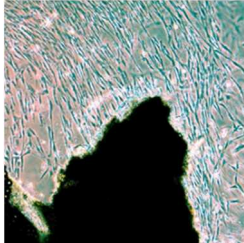
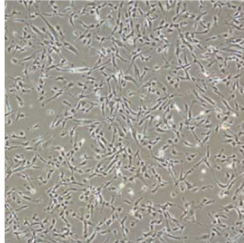
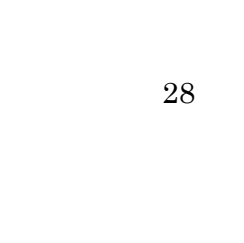
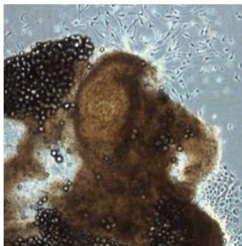
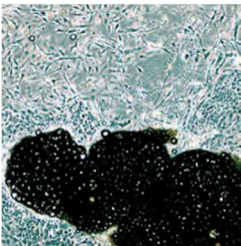
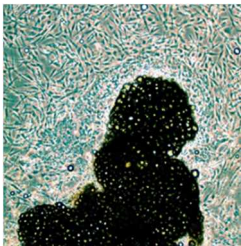
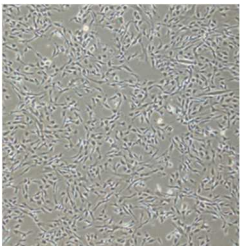
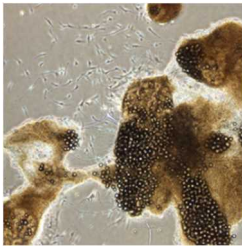
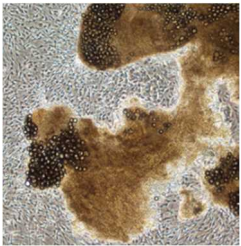
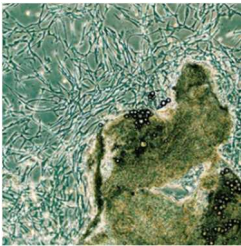
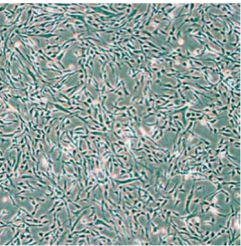
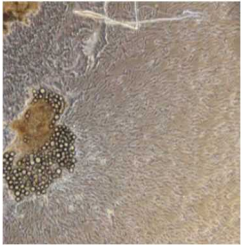
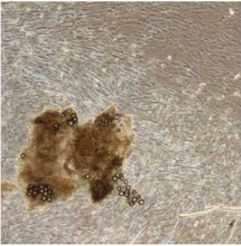
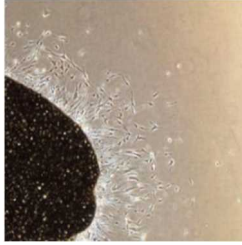
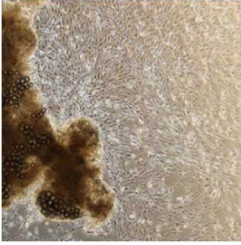
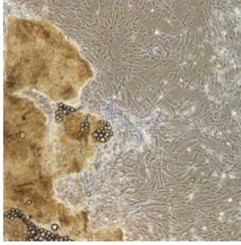
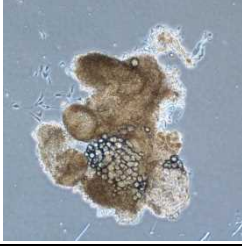
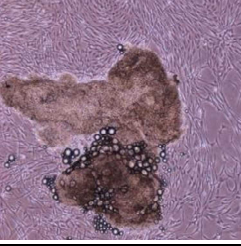
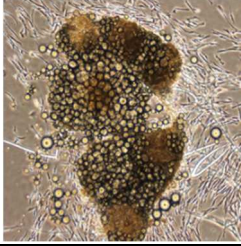
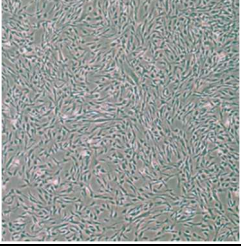
症例	培 養 経 過			(対物 4 倍)
症例 1	7 日目	15 日目	22 日目	継代 4 日目
				
	6 日目	17 日目	23 日目	継代 4 日目
				
症例 2	8 日目	11 日目	19 日目	継代 4 日目
				
	8 日目	15 日目	18 日目	継代 4 日目
				
症例 3	8 日目	14 日目	21 日目	継代 4 日目
				
	8 日目	14 日目	21 日目	継代 4 日目
				
症例 4	8 日目	14 日目	21 日目	継代 4 日目
				
	8 日目	14 日目	21 日目	継代 4 日目
症例 5	8 日目	14 日目	21 日目	継代 4 日目
	8 日目	14 日目	21 日目	継代 4 日目

表 9-2 線維芽細胞増殖経過の顕微鏡観察像

症例	培 養 経 過			(対物 4 倍)
症例 6	6 日目	13 日目	16 日目	継代 4 日目
				
症例 7	7 日目	13 日目	22 日目	継代 4 日目
				
症例 8	7 日目	12 日目	23 日目	継代 4 日目
				
症例 9	6 日目	12 日目	23 日目	継代 4 日目
				
症例 10	5 日目	12 日目	20 日目	継代 4 日目
				

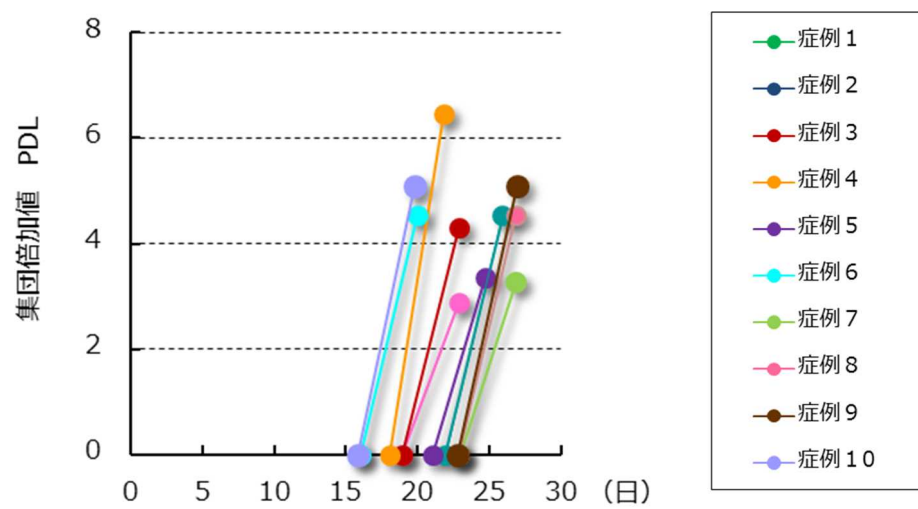


図 10 セルストック作製までの線維芽細胞の増殖比較

表皮細胞・線維芽細胞のセルバンク作製

表皮細胞は、セルストックの特性解析により 4 例を選定し、継代培養を行って製造原材料の候補となる MCB、WCB から構成されるセルバンクを作製した。

具体的には、セルストックの特性解析として、10 例のセルストックを解凍後、WCB として設定した 4 継代目までの細胞増殖経過を評価した（図 11）。その結果、増殖が良好であった症例 1、症例 2、症例 4 および症例 7 の 4 例を選定した。続いて、適切な製造スケールを評価した上で、製造業へ技術移管し、台帳や文書を整備すると共に製造体制の構築を行い、GCTP 省令に従って 4 例のセルストック由来の MCB、WCB を構築した。さらに、WCB の細胞凍結ストックを 1 本解凍し、P10 まで継代培養して CAL を構築した（表 10）。CAL 作製に至るまでに 1 例の細胞増殖が低下したため、残りの 3 例（症例 2、症例 4 および症例 7）をセルバンクの候補とし、MCB、WCB、CAL に対する安全性および品質評価試験を実施した。CAL を構築するため継代培養した際の継代時に得られる細胞懸濁液を用いてコロニー形成能を評価した結果、何れも培養の経過とともにコロニー形成率は低下し、増殖不全コロニー含有率は増加する傾向が観察された。

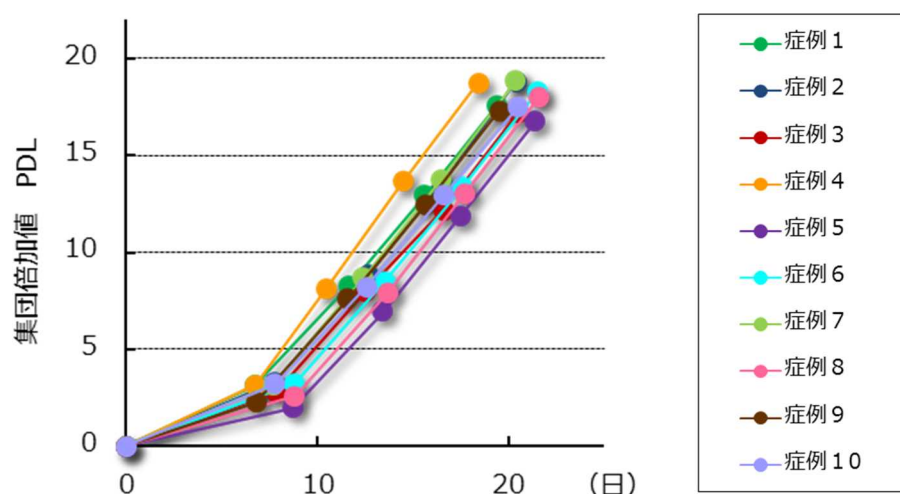


図 11 P4 までの表皮細胞の増殖能の比較

表 10 表皮細胞のセルバンク作製

症例	MCB	WCB	CAL
症例 1	2 継代：165 本	4 継代：280 本	10 継代：5 本
症例 2	2 継代：193 本	4 継代：400 本	10 継代：8 本
症例 4	2 継代：68 本	4 継代：93 本	10 継代：7 本
症例 7	2 継代：163 本	4 継代：87 本	10 継代：12 本

セルバンクの安全性評価試験として、G-band 分染法による核型分析試験、無菌試験、NAT によるマイコプラズマ否定試験を実施し、品質評価試験として 3 例の WCB 由来の培養表皮を作製し、培養表皮の生細胞数、生理活性物質量を測定した。

i) 安全性評価試験

セルバンクを構築した 4 例（症例 1、症例 2、症例 4 および症例 7）の核型異常の有無と遺伝学的安定性を確認する目的で、MCB、WCB および CAL に対する G-band 分染法による核型分析を実施した。倍加していない 100 個の細胞の分裂像を対象とし染色体数を計測し、400 バンドレベル以上の 5 細胞を選定しカリオタイピングを実施した。

その結果、何れも染色体数の最頻値は、正常本数である 46 本であった。それぞれの染色体数の異常は、3 細胞以上で共通の箇所では確認されなかったため、クローン性はないと判断した。また、カリオタイピングに供した 5 細胞の核型については、構造異常は認められなかった。しかしながら、症例 2 および症例 7 の MCB では、400 バンドレベル以上の細胞を選定中に、より解像度が低い 400 バンドレベル未満の 1 細胞に構造異常が確認された。構造異常が観察された細胞のクローン性の有無を確認するため、症例 7 の MCB について 300~400 バンドレベル 15 細胞の追加解析を実施した結果、構造異常は認められなかった。WCB および CAL では構造異常が確認されなかった結果を踏まえて、症例 7 の MCB で確認された構造異常をもつ細胞にはクローン性はなく、細胞分裂時に確率的に発生する構造異常であることが示唆された。

続いて、セルバンクを構築した 4 例の無菌性を確認するため、MCB、WCB および CAL に対し、日本薬局方記載のメンブランフィルター法による無菌試験および NAT によるマイコプラズマ否定試験を実施し、何れの検体も無菌試験およびマイコプラズマ否定試験に適合することを確認した。

ii) 品質評価試験

セルバンクを構築した 3 例（症例 2、症例 4 および症例 7）の品質を評価する目的で、WCB の細胞凍結ストックを 1 本解凍し、1 継代後に培養表皮を作製し、細胞シートの生細胞数を評価した。生細胞数は、トリプシンで培養表皮を細胞分散した懸濁液を用いたトリパンブルー生死判別、および生検パンチで打ち抜いた培養表皮を用いた MTT アッセイによる吸光度測定で 2 通りで評価した。その結果、症例 4 の生細胞数は症例 2、症例 7 と比較して、トリパンブルー生死判別法および MTT アッセイ共に低い傾向を示した。

続いて、培養 7 日目の培養上清および培養表皮の抽出物を検体として、培養表皮が産生するサイトカインについてサイトカインアレイを用いて網羅的に解析した。対照として用いる表皮細胞培養用培地より 1.5 倍以上のシグナル強度を示す場合に、該当するサイトカインが産生されたと判断した。対照培地と比較したシグナル強度が高い上位 20 種のサイトカインを順に並べた結果、3 例の産生プロファイルは類似していた（図 12）。また、産生が認められた上位 10 種のサイトカインの作用を調査したところ、創傷治癒への関与が示唆されるサイトカインの産生が認められた（表 11）。

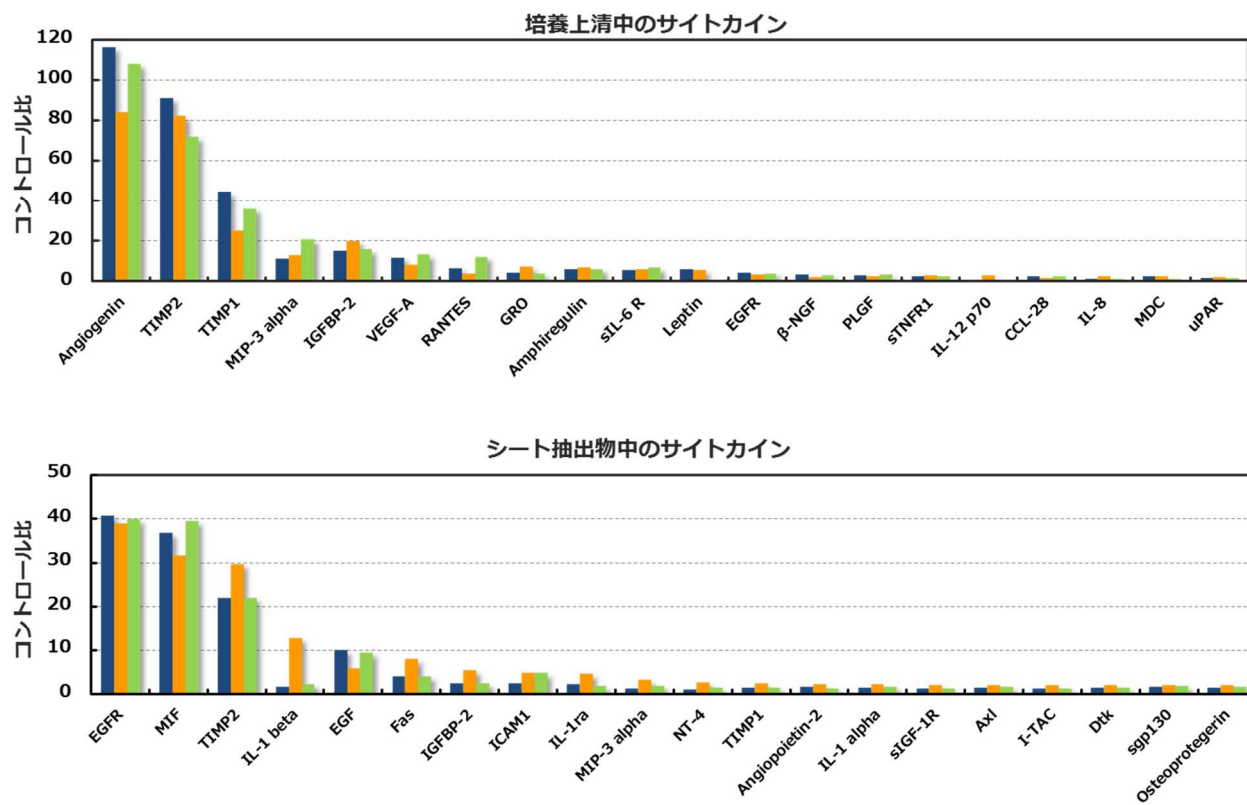


図 12 セルバンク由来表皮細胞が産生するサイトカイン上位 20 種
(カラム左から 紺：症例 2、黄：症例 4、黄緑：症例 7)

表 11 セルバンク由来表皮細胞で産生が確認されたサイトカインの作用

《培養上清》

強度順	サイトカイン種	作用
1	Angiogenin	血管新生促進
2	TIMP-2	線維芽細胞に電気刺激を与えると増加
3	TIMP-1	血管新生に関与
4	MIP-3 alpha	IL-8 と同様の挙動、熱傷の滲出液に増加
5	IGFBP-2	血管新生促進、表皮前駆細胞と表皮細胞との結合に必要
6	VEGF-A	血管内皮細胞の増殖、血管新生促進
7	RANTES	ケラチノサイト、リンパ球、内皮細胞の活性促進
8	GRO	GRO alpha は血管新生促進、GRO beta は好中球、単核球の活性促進
9	Amphiregulin	ケラチノサイト産生
10	IL-8	好中球の遊走促進、血管新生促進

《シート抽出物》

強度順	サイトカイン種	作用
1	EGFR	表皮細胞の増殖促進
2	MIF	腫瘍形成促進、血管新生促進
3	TIMP-2	線維芽細胞に電気刺激を与えると増加
4	IL-1beta	表皮細胞・線維芽細胞の増殖促進
5	EGF	表皮細胞の増殖促進（幹細胞維持）、線維芽細胞の幼若性促進
6	Fas	アポトーシス促進
7	IGFBP-2	血管新生促進、表皮前駆細胞と表皮細胞との結合に必要
8	ICAM1	皮膚表面への好中球分泌
9	IL-1ra	炎症阻害
10	MIP-3 alpha	IL-8 と同様の挙動、熱傷の滲出液に増加

3 例のセルバンクの安全性および品質評価試験のまとめを表 12 に示す。培養初期の増殖速度は症例 4 が最も良好であったが、MCB の製造本数および最終製品の品質評価試験結果は、症例 2、症例 7 の方が優位であった。症例 2 と症例 7 は全試験を通じてほぼ同等の結果が得られているものの、症例 7 は最終製品作製時の細胞増殖が最も良好であった点、症例 2 は繰り返して MCB の核型異常が観察された点等を総合的に踏まえて、症例 7 を ICH-Q5A のウイルス試験に供する 1 例に選定した。

表 12 セルバンク 3 例の安全性および品質評価試験のまとめ

項 目		症例 2	症例 4	症例 7
ウイルス検査（ドナー適格性確認）		○	○	○
MCB 本数		○	△	○
細胞増殖	MCB (P2) → WCB (P4)	○	◎	○
	WCB (P4) → CAL (P10)	○	△	◎
最終製品	培養表皮の生細胞密度	○	△	○
	最終培養日数	差なし		
	サイトカイン産生	プロファイルに顕著な差なし		
セルバンク	無菌試験 / マイコプラズマ否定試験	○	△	○
	核型分析	異常なし ※MCB の 1 細胞の低バンドレベルで異常あり	異常なし	異常なし ※MCB の 1 細胞の低バンドレベルで異常あり

線維芽細胞は、セルストック 10 例から増殖が良好な 3 例を選定した。10 例のセルストックを継代培養して細胞数を拡大し、MCB の想定継代数、WCB の想定継代数まで培養した。このうち、増殖が良好であった 4 例について、CAL の想定継代数まで培養を継続した。その結果から、増殖が良好な 3 例のセルストックを選定した。

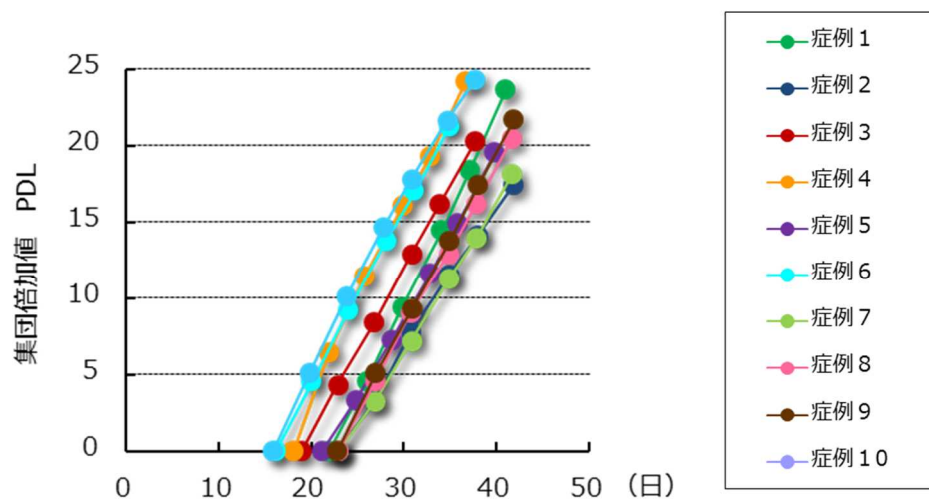


図 13 線維芽細胞セルストック 6 継代までの増殖比較

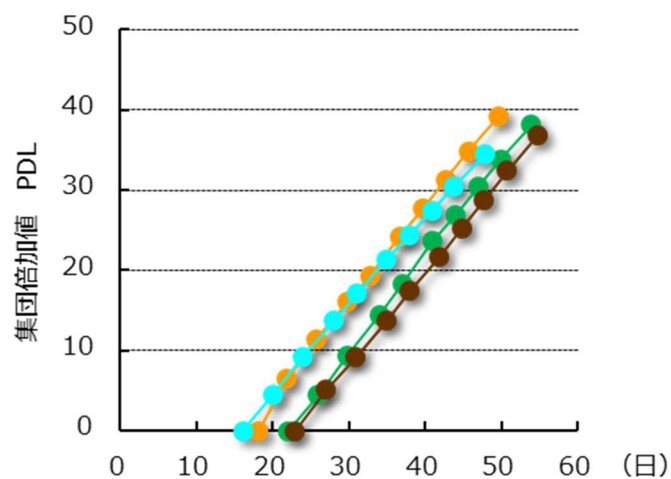


図 14 線維芽細胞セルストック 10 継代までの増殖比較

表皮細胞・線維芽細胞の ICH-Q5A 対応

商業用セルバンクのウイルス検査項目に関しては、同種培養表皮を相談品目とした薬事戦略相談対面助言（再生医療等製品等の品質及び安全性に係る相談；2016 年 2 月及び 2016 年 7 月実施）において提案したウイルス安全性評価のスキームと商業用セルバンクに対する検査項目（表 13）について、PMDA から受け入れ可能であると判断された。

ヒト表皮細胞の商業用セルバンクに対する安全性評価の考え方は以下の通りである。

ウイルスリスクを広く把握する観点から、作製する WCB の CAL に対して実施するレトロウイルスおよび内在性ウイルス試験は、感染性試験、電子顕微鏡観察および逆転写酵素活性試験が必要と考え、当該試験を設定した。感染性試験については、初回の WCB 作製時の CAL では、延長 S+L アッセイおよび延長 XC プラークアッセイを実施し、異種および両種指向性、ならびに同種指向性のレトロウイルスの有無を確認すべきと考えた。また、ウイルス安全性の観点から、*In vitro* 試験で用いる HeLa 細胞を HEK293 細胞へ変更を検討した

表 13 表皮細胞の商業用セルバンクで行うウイルス検査

試 験	MCB	WCB 2 nd ～	CAL
レトロウイルスおよび内在性ウイルス試験			
感染性試験（ヒトウイルス標的細胞）	+	+	+
感染性試験（延長 S+L フォーカス・延長 XC プラーク）	+	+	+
電子顕微鏡観察	+	+	+
逆転写酵素活性	+	+	+
非内在性ウイルスまたは外来性ウイルス試験			
<i>In vitro</i> 試験	+	+	+
<i>In vivo</i> 試験	+	+	+
マウス抗体産生試験	—	—	+
NAT（HBV, HCV, HIV, HTLV, PV B19, CMV, EBV, WNV）	+	+	+

＋：実施、－：実施しない

選定した症例 7 の表皮細胞セルバンクに対するウイルス検査を行った。NAT は東京医科歯科大学に、電子顕微鏡観察によるウイルス検査は国内の検査会社に、その他のウイルス検査は米国のウイルス検査会社に委託した。その結果、ヒトウイルス標的細胞を用いた感染性試験、延長 S+L アッセイおよび延長 XC プラークアッセイ、電子顕微鏡観察、逆転写酵素活性試験、*In vivo* 試験、*In vitro* 試験およびマウス抗体産生試験については、全ての項目で信頼性基準における適合を確認した（表 14）。本研究においてウイルス安全性を担保した同種セルバンクの構築に成功した。

表 14 表皮細胞セルバンクのウイルス検査結果

試 験	MCB	WCB 2 nd ～	CAL
レトロウイルスおよび内在性ウイルス試験			
感染性試験（ヒトウイルス標的細胞）	適合	—	適合
感染性試験（延長 S+Lフォーカス・延長 XC プラーク）	適合	—	適合
電子顕微鏡観察	適合	—	適合
逆転写酵素活性	適合	—	適合
非内在性ウイルスまたは外来性ウイルス試験			
<i>In vitro</i> 試験	適合	—	適合
<i>In vivo</i> 試験	適合	—	適合
マウス抗体産生試験			適合
NAT（HBV, HCV, HIV, HTLV, PV B19, CMV, EBV, WNV）	適合※	—	適合※

※予備試験実施

セルバンクスケールの評価

研究用ヒト表皮細胞の連続継代試験によって増殖確認を行った結果、10 継代目まで細胞増殖能が低下しないことを確認した。また、増殖経過の回収細胞数から細胞ストックの製造本数の理論値を算出すると、4 継代目に相当する細胞が約 10 万本 (1×10^6 個/本) 製造できることが分かった (図 15)。同種培養表皮の製品製造時は、WCB を解凍・播種し、1 継代を経てシート化し最終製品とすることを想定している。すなわち、10 万本の WCB から約 1,000 万個の最終製品が製造可能であると考えられる。同種培養表皮の最大出荷数を年間 10 万個と推定した場合、4 継代目の細胞ストックを WCB として設定することにより、半世紀以上に渡って製造を継続可能であると判断した。また、2 継代目の細胞ストックを MCB として設定し、MCB を解凍・播種後 1 継代を経て WCB を作製することとした。

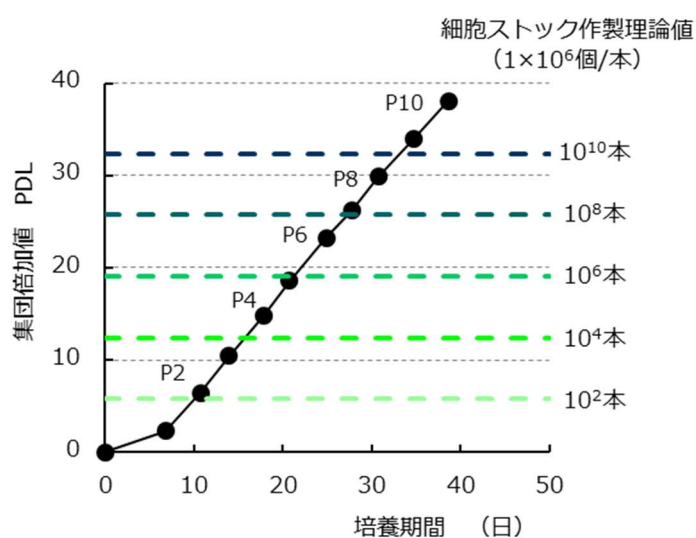


図 15 表皮細胞凍結細胞ストックの作製本数の評価

本研究では、症例 7 の MCB を約 150 本作製した。セルバンク構築時の細胞増殖の経過および培養表皮の試製造の結果より、MCB 1 本から WCB が約 400 本作製でき、WCB 1 本から最終製品が約 300 個製造できることから、構築した MCB のスケールは、最終製品 約 1,800 万個に相当することが試算できる。これらのセルバンクの実績は、上記のヒト表皮細胞の連続継代試験より得られた理論値と同等であった。連続継代試験よりセルバンクの継代数やスケールを試算する方法は、線維芽細胞を始め他細胞のセルバンクを構築する場合も有用であることが示唆された。

3) 同種培養皮膚の設計

表皮細胞・線維芽細胞の培養法の評価

i) 表皮細胞の培養

ヒト表皮細胞は再生医療等製品である自家培養表皮ジェイス®の製造工程に準じて培養すると、原材料の皮膚以外は、培地や資材については生原基への適合を含む安全性が担保される。商業セルバシクの構築の目的で受け入れた 10 例の皮膚組織から分離・培養した表皮細胞は、ジェイス®の製造工程と同等もしくは同等以上の順調な経過を示した（表 8、図 8）。

ii) 線維芽細胞の培養

線維芽細胞は、皮膚組織の真皮の外植法によって分離・培養することとした。

しかし、これまでに使用を想定していた A 社の線維芽細胞専用培地について製造元とヒアリングしたところ、専用培地には動物由来物が含有されており、生原基に適合していないことが明らかとなった。そのため A 社製の培地と同等の細胞増殖能を示し、かつ血管新生誘導能を有する未成熟型の線維芽細胞が培養可能な培地を新たに開発することとした。

その結果、臨床使用で実績のある B 社製の線維芽細胞専用培地を見出し、さらに成分の最適化として 10%ウシ胎児血清と増殖因子を添加することにより、改良型の線維芽細胞専用培地を新たに開発することができた。この改良型の B 社製専用培地は、汎用されてきた 10%ウシ胎児血清含有培地よりも増殖速度が速く、また血管新生誘導能を有する未成熟型の線維芽細胞の培養が可能であり、A 社製の専用培地に類似した性能が発揮されることを確認した（図 16）。

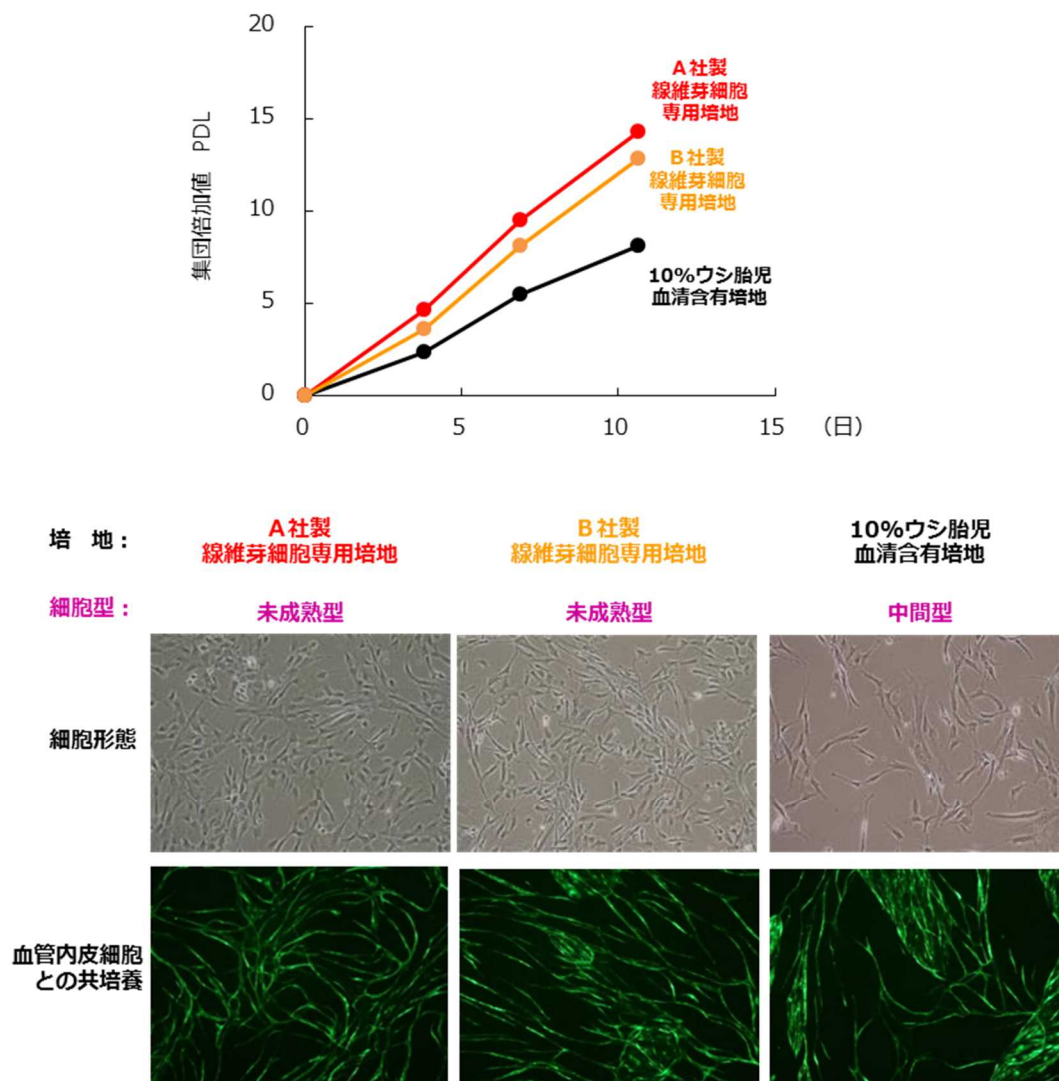


図 16 改良型の線維芽細胞専用培地の開発
(上：細胞増殖、下：細胞形態と血管新生誘導能評価)

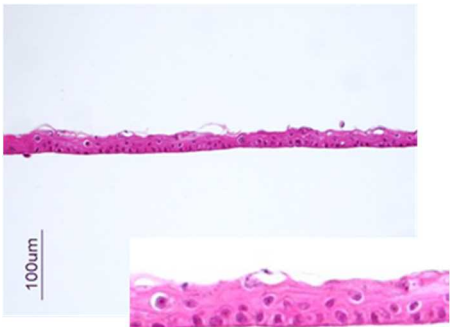
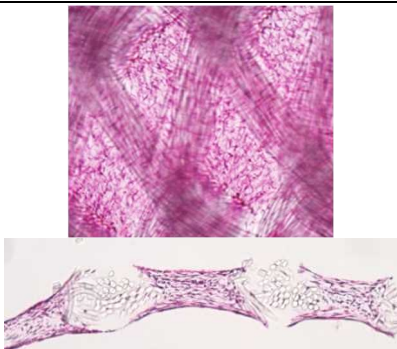
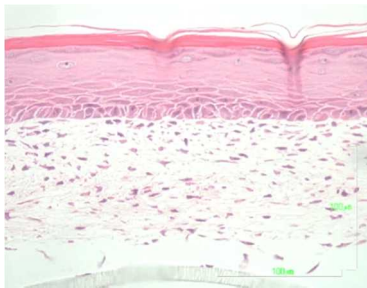
細胞種、材料、凍結仕様の策定と決定

本研究で開発する同種培養皮膚に組み込まれる細胞種は、ヒト表皮細胞およびヒト線維芽細胞である。

表皮細胞と線維芽細胞を組み込んだ培養皮膚の製品仕様は、表皮細胞を用いた「培養表皮」、線維芽細胞を用いた「培養真皮」および両方の細胞を用いた「複合型培養皮膚」が想定でき、何れも海外では製品化されており、われわれも既に試作品を作製している（表 15）。

最初に、自家培養表皮ジェイス®の製造工程を同種細胞として作製する「同種培養表皮」と、生分解性メッシュに線維芽細胞を播種した「同種培養真皮」の設計を行った。何れの製品も、無菌的にパッケージして凍結保存可能な仕様を想定しており、製造工程における材料や凍結仕様を検討した。

表 15 想定される同種培養皮膚の仕様

種類	特徴・外観・開発例	試作品の組織学像
培養表皮	 【Green 型培養表皮】 ・ジェイス®を同種細胞とした仕様。 ・3T3-J2 細胞をフィーダーとして、ヒト表皮細胞を培養した細胞シート。 海外製品例：韓国「Kaloderm®」	
培養真皮	 【線維芽細胞シート】 ・生分解性メッシュを基材にヒト線維芽細胞を培養した細胞シート。 海外製品例：米国「Dermagraft®」	
複合型培養皮膚	 【3次元培養皮膚】 ・ヒト線維芽細胞を基質に培養した構造体にヒト表皮細胞を重層培養することにより皮膚組織を完全に再現した細胞シート。 海外製品例：米国「Apligraf®」	

i) 同種培養表皮のパッケージ仕様の開発

同種培養表皮は大量生産を前提とした仕様設計が必須である。

少量生産の自家培養表皮ジェイス®の製造工程では、培養フラスコから表皮細胞シートを剥離する際に、培養表皮の周囲を不織布（以下、キャリア）に折り上げる工程がある。表皮細胞シート単独では収縮してしまうため、移植床まで移動する目的でキャリアに付着させて懸架する仕様である。表皮細胞シートは非常に薄く脆弱なため、破損することなくキャリアに折り上げる操作は、機械による自動化が困難であり大量生産を阻む一因となっている。そのため機械化を前提とした大量生産に適した細胞シートの剥離工程の開発を開始した。

細胞シートの剥離工程として、医療用接着剤によってキャリアと培養表皮を接着固定する方法、およびゼラチン等のゲル化剤により培養表皮を固定する方法を検討した。その結果、何れの方法でも固定によって懸架作業の効率は上がったが、接着剤やゲル化剤の添加量に応じて生細胞数が低下したことから、自動化装置の製造に向けて細胞毒性の少ない条件を探索する必要がある。

ii) 同種培養表皮の凍結法の開発

同種培養表皮は、凍結保存できる仕様設計とするため、表皮細胞シートを凍結保存する際に用いる凍結保存液を評価した。

凍結保存液は市販の動物由来成分不含の凍結液を候補とし、凍害防止剤として **DMSO** を含有する溶液 3 種、**DMSO** 不含の溶液 4 種を評価した（表 16）。試験では、各凍結保存液を用いて表皮細胞シートを -80°C で凍結し、 37°C の温浴槽にて解凍した後、トリパンブルー排除能による生細胞数の計数、および細胞シートを用いた **MTT** アッセイによる吸光度測定 の 2 通りで評価した。その結果、何れの評価法でも、**DMSO** を含有した凍結保存液は、**DMSO** 不含の凍結保存液と比較して細胞生存率が良好であった（図 17）。

候補となる **DMSO** 含有凍結保存液について、凍結液の組成が生原基に適合することを最低条件として、凍結保存液の全ての添加物について再生医療等製品が最大量移植された場合の安全性評価を行い、最終製品に使用する凍結保存液を選択する。

表 16 同種培養表皮で評価した市販の凍結保存液

凍結保存液 (メーカー)	開示されている主な組成	推奨凍結法	マスターファイル (MF) 対応等
① DMSO 含有培地 (C 社)	10%DMSO、動物由来成分不含 ケミカリーディファインド	-80℃ 緩慢	MF 登録・GMP 準拠製造
② DMSO 不含培地 (C 社)	DMSO 不含、動物由来成分不含、 ケミカリーディファインド	-80℃ 緩慢 / プログラム凍結	MF 登録予定・GMP 準拠製造
③ DMSO 含有培地 (D 社)			
④ DMSO 含有培地 (E 社)	10%DMSO、動物由来成分不含	-80℃ 緩慢	MF 登録・GMP 準拠製造
⑤ DMSO 不含培地 (F 社)	DMSO 不含、動物由来成分不含	-80℃ 緩慢	
⑥ DMSO 含有培地 (G 社)	10%DMSO、動物由来成分不含、 ケミカリーディファインド	-80℃ 緩慢	
⑦ DMSO 不含培地 (H 社)	DMSO 不含、動物由来成分不含、 ケミカリーディファインド	-80℃ 緩慢	ISO13485 認証製造
⑧ DMSO 含有培地 (I 社)	(不 明)	液体窒素 急速	組織保存用

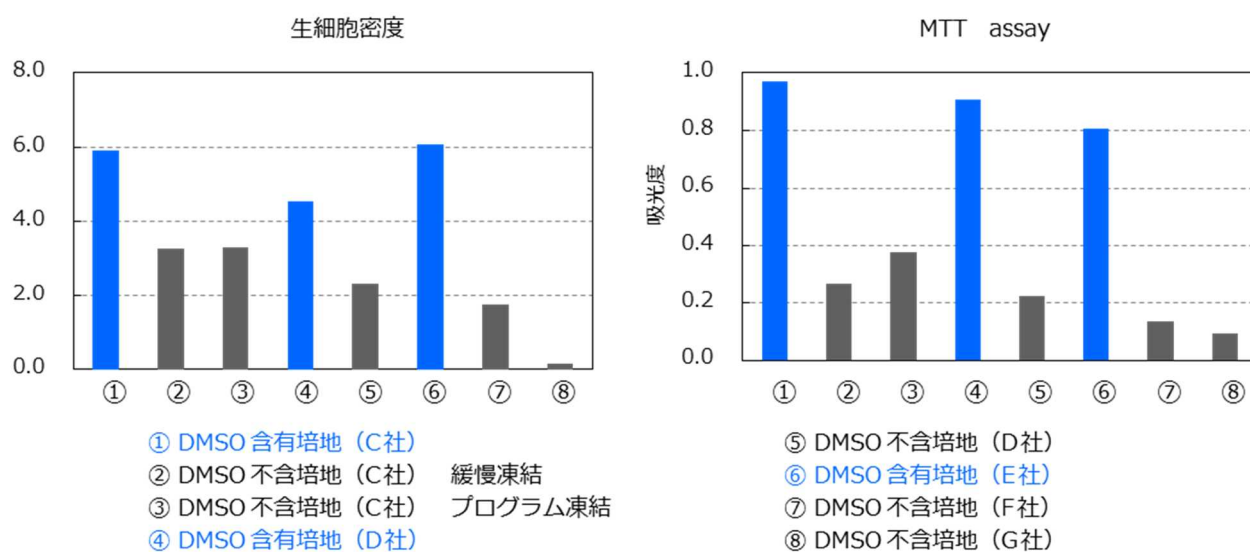


図 17 各凍結保存液における培養表皮凍結後の生細胞数の評価

iii) 同種培養表皮の凍結保存・解凍方法の開発

同種培養表皮の凍結保存および使用時の解凍条件を評価した。

医療機関や代理店では、-80℃以下の超低温冷凍庫の所有は限定的である。汎用冷凍庫での保管を想定し、培養表皮を選定した 3 社の DMSO 含有凍結保存液を用いて-30℃で 1 日および 8 日間保管後の生細胞数を評価した結果、保管後の生細胞数は-80℃保管検体より 80%低下した (図 18)。これは、保管温度が氷晶形成温度帯に近いことから、細胞内外に氷晶が形成され細胞障害が起こったためと考察できる。最終製品の生細胞を維持するためには、-80℃以下の超低温冷凍庫の設置が望ま

しく、製品化までには製品の輸送方法と代理店や医療現場における保管法を検討する必要がある。

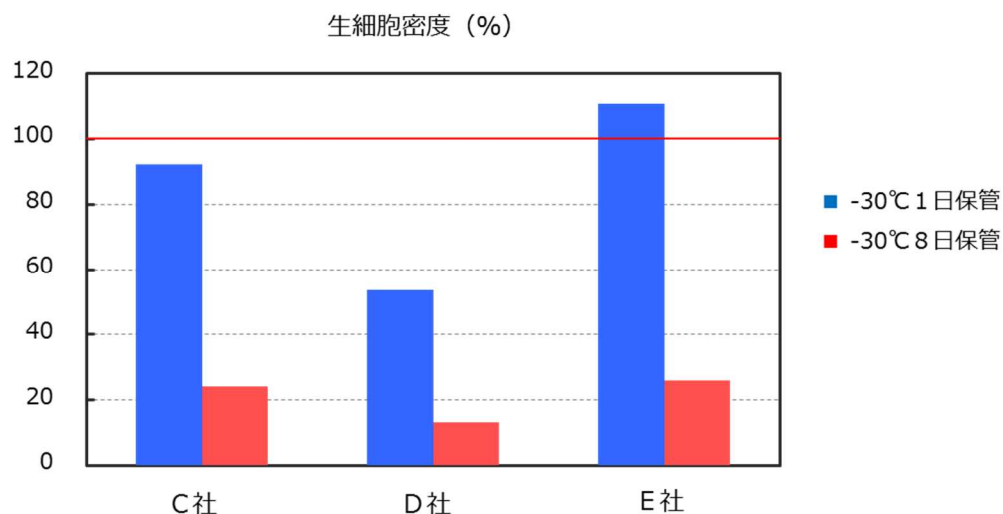


図 18 -30℃保管時の培養表皮の生細胞密度
(C 社 DMSO 含有培地 -80℃保存時を 100%換算)

iv) 同種培養真皮の凍結法の開発

同種培養真皮は、凍結保存できる仕様設計とするために凍結に用いる凍結保存液を評価した。

凍結保存液は市販の動物由来成分不含の凍結液を候補とし、凍害防止剤として DMSO を含有する溶液 3 種、DMSO 不含の溶液 1 種について、自社調製した DMSO / 血清含有培地と比較評価した (表 17)。試験では、各凍結保存液を用いて作製した培養真皮を、製品パッケージを探索する目的でパウチ型、もしくはコンテナ型の凍結容器に封入して-80℃で緩慢凍結し、37℃の温浴槽にて解凍した後、MTT アッセイによる吸光度測定で評価した。その結果、自社調製の DMSO / 血清含有培地と市販の DMSO 不含のクライオスカーレス DMSO フリーを用いることで、未凍結品と比較して 70%を超える解凍率を得ることができた (図 19)。製品パッケージに関してもパウチ型、もしくはコンテナ型でも解凍率には影響しなかった。

表 17 同種培養真皮で評価した市販の凍結保存液

凍結保存液 (メーカー)	開示されている主な組成	推奨凍結法	マスターファイル (MF) 対応 定価 等
DMSO / 血清含有培地 (自社調製)	10%DMSO、ウシ胎児血清 DMEM	-80℃ プログラム フリージング	—
DMSO 含有培地 (C 社)	10%DMSO、動物由来成分不含 ケミカルリーディファインド	-80℃ 緩慢	MF 登録・GMP 準拠製造
DMSO 含有培地 (D 社)	10%DMSO、動物由来成分不含	-80℃ 緩慢	MF 登録・GMP 準拠製造
DMSO 不含培地 (H 社)	DMSO 不含、動物由来成分不含	-80℃ 緩慢	生原基適合調査済

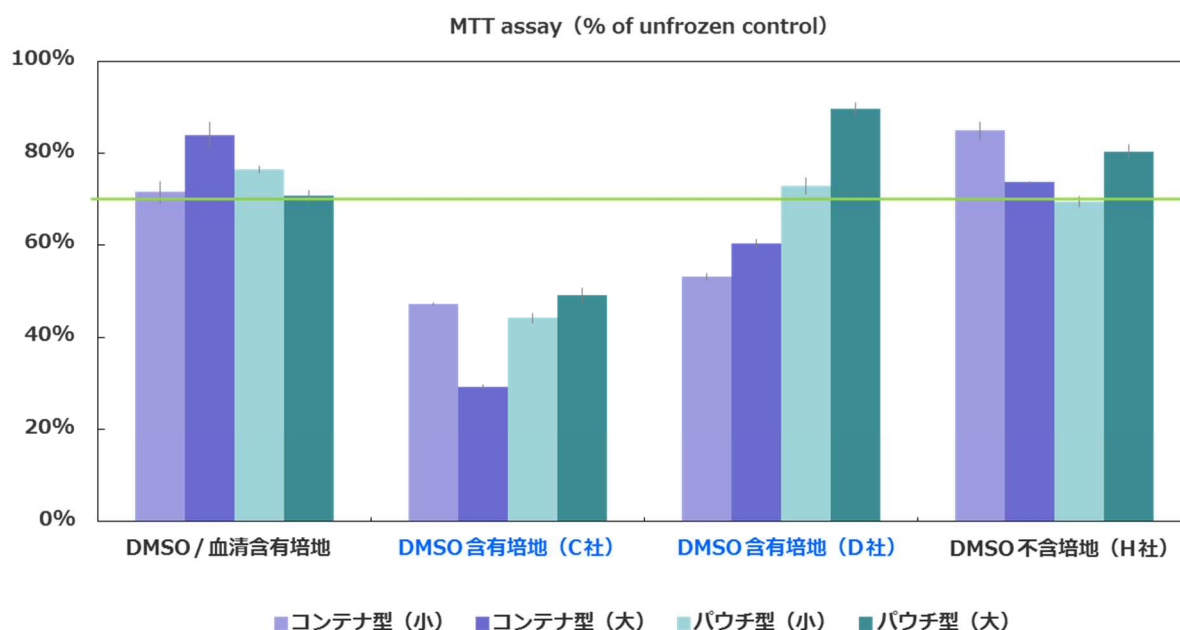


図 19 培養真皮の凍結保存条件探索

工程由来物残留量と遺伝学的評価の検証

製品化を想定する同種培養表皮と同種培養真皮について、最終製品の安全性評価として工程由来物の残留量や核型分析を行う必要がある。同種培養表皮の工程由来物の残留量については、自家培養表皮ジェイス®と同じ製造工程については既に評価検証済みと考えて良いが、凍結保存製品とするために用いる凍害防止剤 **DMSO** の残留については新たに検討する必要がある。同種培養真皮については、製造工程由来物のリスク分析を行い、最終製品への残留量を測定した。

表皮細胞シートの凍結には **DMSO** を含有した凍結保存液が適していることから、凍結した表皮細胞シートの **DMSO** 残留量を評価した。同時に、製品の使用時に表皮細胞シートを洗浄することによって **DMSO** の残留量を低減できることを確認した。

表皮細胞シートを 10% **DMSO** 含有培地を用いて-80℃で凍結し、37℃で解凍後に洗浄操作を繰り返した。超音波処理により細胞シートを可溶化した遠心上清を検体とし、GC-MS で **DMSO** を定量した。その結果、洗浄回数に依存した洗浄効率が確認され、2回の洗浄操作で表皮細胞シートの **DMSO** 残留量は半減した（表 18）。

同種培養真皮の製造工程由来物として、専用培地に添加されるウシ胎児血清、抗生物質、生理活性物質等の培地成分があるが、最終製品への残留量は **DMSO** の洗浄効率に準じて低減されることが期待できる。

表 18 凍結培養表皮に残留する DMSO 量の定量

検 体	表皮細胞シート 150 cm ² 中の DMSO 量
DMSO 不含表皮細胞シート	定量下限 (0.8 mg) 未満
DMSO 含有凍結保存液：洗浄なし	52 mg
DMSO 含有凍結保存液：洗浄 1 回	35 mg
DMSO 含有凍結保存液：洗浄 2 回	20 mg

生理活性物質産生と動物移植試験の検証

製品化を想定する同種培養表皮と同種培養真皮について、最終製品の有効性評価として最終製品における生理活性物質の産生能を評価するとともに、既に、同種培養表皮と同種培養真皮における動物を用いた評価法探索試験を実施した。

i-ii) 糖尿病マウスの全層欠損に対する同種培養表皮の有効性の検討

同種培養表皮の有効性評価試験として、凍結保存したヒト表皮細胞シートを糖尿病（以下、DM）マウスの全層欠損モデルに移植する試験を実施した。J-TEC が培養表皮を作製し、京都大学が動物への移植試験と評価を行った。

移植検体として、①fresh 群：凍結保存せず 48 時間以内に使用するもの、②cryopreserved 群：凍害防止剤 DMSO を含有する培地を用いて -80℃ で凍結保存後に解凍したものをを用いた。動物モデルは、DM マウス（BKS.Cg db/db マウス、雄、12 週齢）の背部に φ 8 mm の皮膚全層欠損創を作製し、培養表皮を移植した群、および control として培養表皮を移植せず創傷被覆材のみを貼付した群を作製し、移植 4、7、14 日後の創面積、および上皮伸展距離を評価した。その結果、移植 7 日後では control 群に対して培養表皮移植群で明らかな創収縮が確認され（図 20）、移植 14 日後でも表皮細胞シートが移植創面に残存することを確認した。

移植部位の組織学的評価では、宿主となったマウスの表皮細胞が創中心に向かって伸展する様子が確認された。また、マウスの背部外観から創面積、組織切片像から新生上皮長を計測した結果、移植群では 7 日目の総面積、新生上皮長の何れも control 群より有意に創傷治癒促進効果が確認された。なお、論文化予定のため詳細なデータについては割愛する。

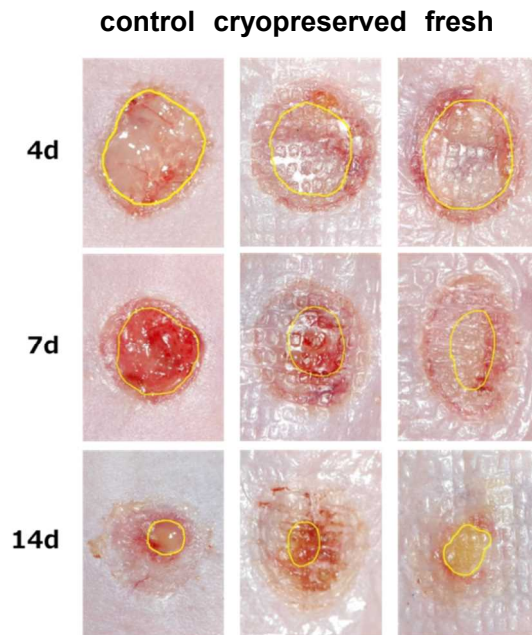


図 20 DM マウスへの培養表皮移植後の経過観察

ii) ラット全層欠損に対する高倍率網状自家植皮と同種培養表皮の移植試験

重症熱傷の治療法として臨床現場で汎用されている高倍率網状自家植皮に、同種培養表皮を併用した際の有効性を推定する目的で、ラットの全層皮膚欠損モデルに同じ個体の 6 倍網状自家植皮を行い、さらにヒト表皮細胞シートを併用した際の創閉鎖について検討した。

F344 雄性ラット (9~10 週齢) の背部に 3×3 cm の全層皮膚欠損創を作製し、切除した皮膚を 6 倍メッシュに掛けたものを移植し、さらにその上にヒト表皮細胞シートを移植した。移植群は前項の①②の培養表皮を移植し、**control** として培養表皮を移植せず創傷被覆材のみを貼付した群を作製し、移植 7 日目の創面積、および上皮伸展距離を評価した。

その結果、前項の DM マウスを用いた移植試験と同様に、全ての培養表皮移植群は、**control** 群と比較して明らかな創収縮が確認された (図 21)。さらに、組織切片を作製し、HE 染色による組織学的評価を行い、新生上皮長を評価したところ、総面積、新生上皮長共に、**control** 群と比べ有意に創傷治癒促進効果が確認された。なお、論文化予定のため詳細なデータについては割愛する。

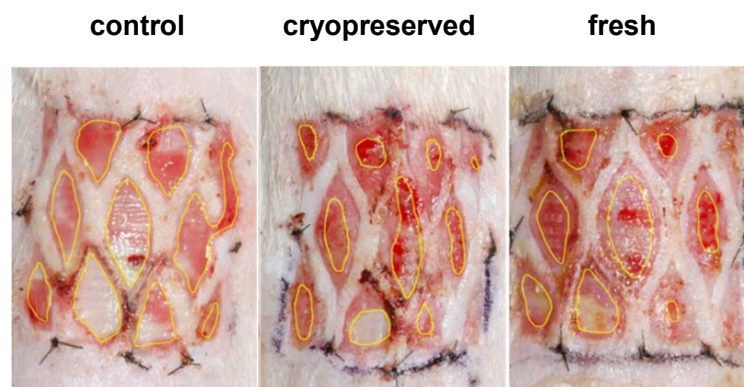


図 21 F344 ラットへの培養表皮移植後の経過観察

iii) 同種培養表皮の生理活性物質産生の解析

開発する同種培養表皮が創傷治癒促進効果を有することを確認する目的で、凍結保存した培養表皮（凍結品）中のサイトカインについてサイトカインアレイを用いて網羅的に解析した。その結果、保存前の培養表皮の産生サイトカインと種類・量ともに類似しており、創傷治癒に関与する因子が多数産生されていることを確認した（表 19）。

表 19 培養表皮含有のサイトカイン（倍率/対照）

fresh（保存前）		cryopreserved（凍結品）	
EGFR	113.2	EGFR	114.5
MIF	35.5	Angiogenin	76.3
TIMP2	32.2	MIF	57.7
ICAM1	31.3	RANTES	39.4
RANTES	29.0	ICAM1	34.2
Amphiregulin	23.6	TIMP2	32.5
IL-1 beta	14.4	Amphiregulin	16.2
sIL-6 R	12.4	sIL-6 R	15.7
Axl	10.9	IL-1 beta	13.0
sgp130	7.5	Axl	12.8
uPAR	6.9	uPAR	12.7
MIP-3 alpha	5.4	sgp130	9.2
IL-1 alpha	4.7	VEGF-A	3.8
VEGF-A	4.1	sTNFR1	3.4
sTNFR1	2.5	IL-1 alpha	3.0
IL-1ra	2.3	Oncostatin M	1.8
Oncostatin M	1.7	BMP-4	1.5
BMP-4	1.6		
計 18 種		計 17 種	

対照培地の 1.5 倍強シグナルのサイトカインを記載

iv) 同種培養真皮の生理活性物質産生の解析

開発する同種培養真皮が創傷治癒促進効果を有することを確認する目的で、未成熟型線維芽細胞を培養できる A 社の線維芽細胞用培地、B 社の改良型線維芽細胞用培地を用いて培養真皮を作製して血管新生誘導能を評価した結果、線維芽細胞の平面培養で確認された血管内皮細胞のネットワークが、培養真皮でも形成されていることを確認した（図 22）。同種培養真皮の移植時に血管新生誘導能により、創傷治癒効果が発揮されることが示唆された。

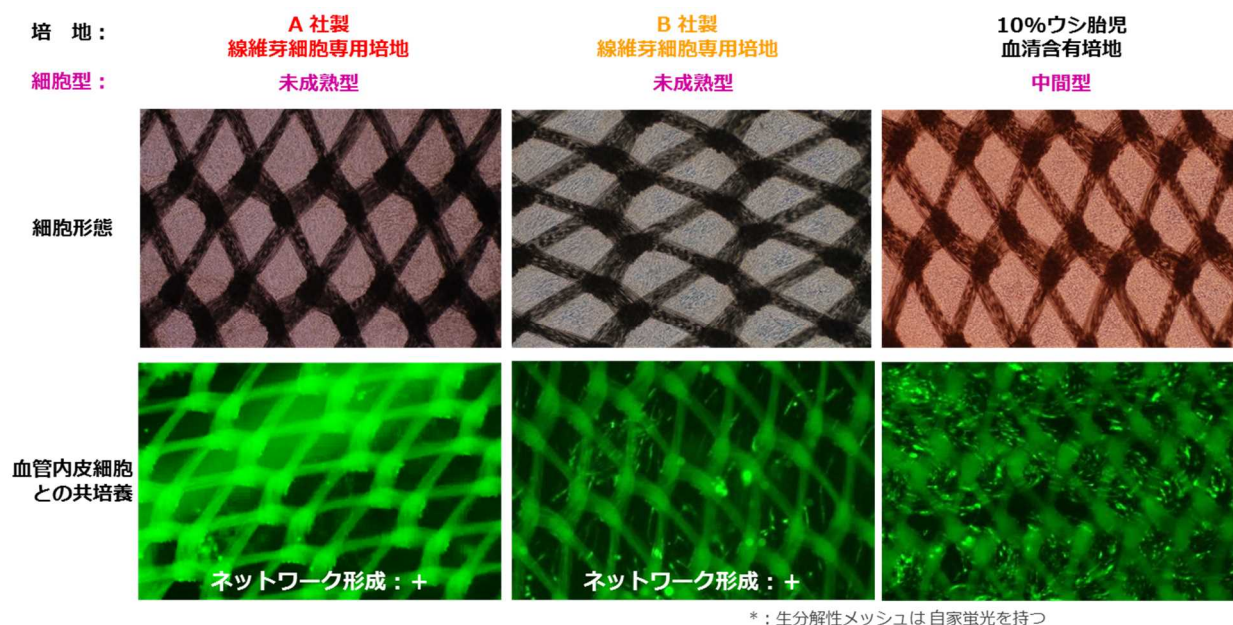


図 22 未成熟型線維芽細胞を組み込んだ培養真皮の血管新生誘導能の評価

v) 同種培養真皮の動物移植試験の検討

同種培養真皮を動物に移植した際の創傷治癒促進効果の試験法および評価法を検討した。

まず、ラット背部全層欠損モデルへの移植試験を行った結果、生分解性メッシュのみを移植するよりも、ヒト線維芽細胞（中間型）が組み込まれた培養真皮を移植した方が、肉芽の形成も良好で、創傷部位の表皮の伸展が発達することを確認した（図 23）。

これまでにラット背部全層欠損モデルの創傷治癒促進効果の評価法として、新生肉芽の面積評価、および抗 CD31 抗体を用いた新生血管の免疫組織学的評価法を確立した。

次に、開発する同種培養真皮が創傷治癒促進効果を有することを確認する目的で、未成熟型線維芽細胞を培養できる A 社の線維芽細胞用培地、B 社の改良型線維芽細胞用培地を用いて培養真皮を作製し、ラット背部全層皮膚欠損モデルに移植した。その結果、未成熟型線維芽細胞を組み込んだ培養真皮は中間型線維芽細胞を組み込んだ培養真皮と同様の創傷治癒促進効果を有していた（図 24）。

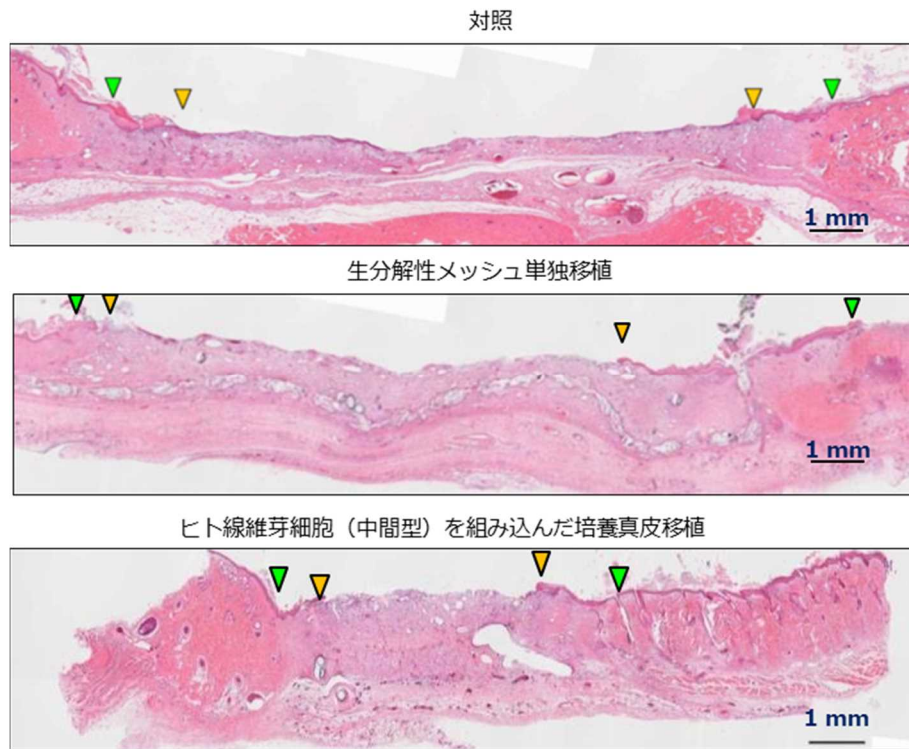


図 23 ラット背部全層欠損モデルにおける培養真皮の創傷治癒促進効果

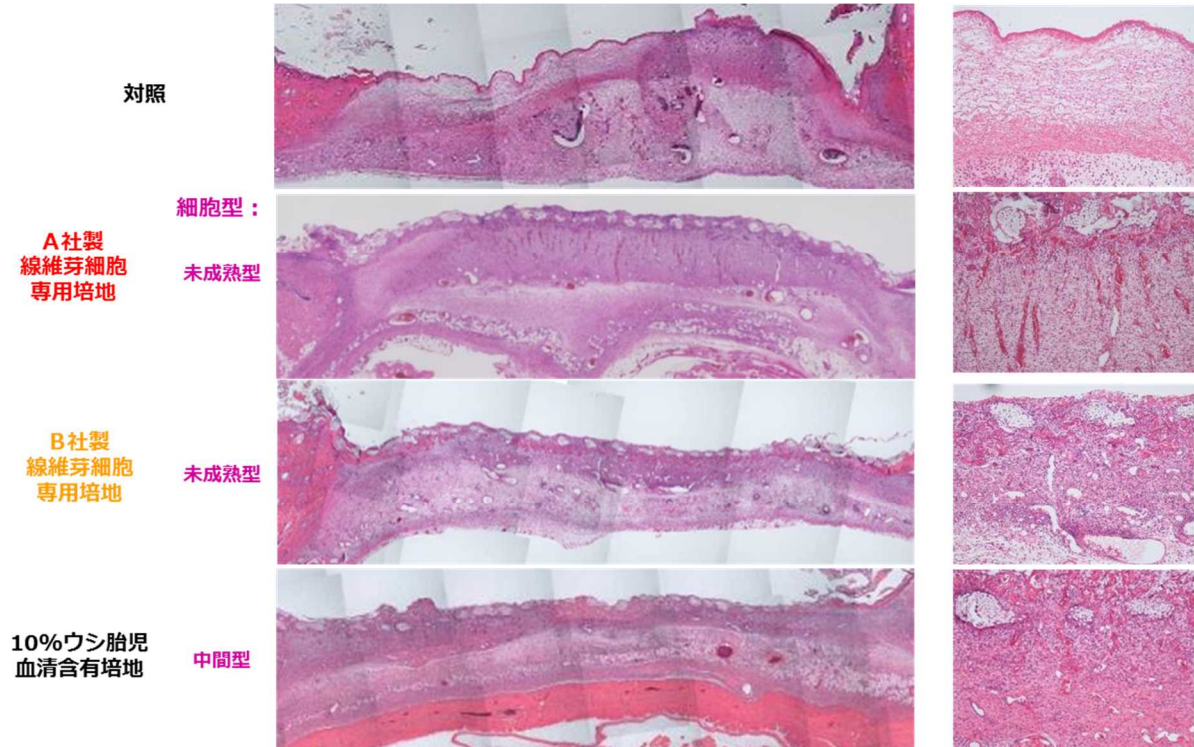


図 24 未成熟型線維芽細胞からなる培養真皮の創傷治癒促進効果

品質設計と出荷規格の策定と検証

同種培養表皮の工程内管理項目および出荷検査項目を策定した。製品の品質特性として、創面になじむ柔軟性と一定の強度が重要と考え、物性試験（強度測定）を出荷検査とする妥当性について検討した。具体的には、培養表皮の破断強度および弾性を測定する強度試験の予備試験として、培養表皮の両端を引張試験機（EZ-LX、島津製作所）の治具に固定後、一定速度でシートが破断するまで引っ張った結果、シート破断時の最大試験力から破断強度を、移動変位と試験力の傾きから弾性を測定することができた。（図 25）。

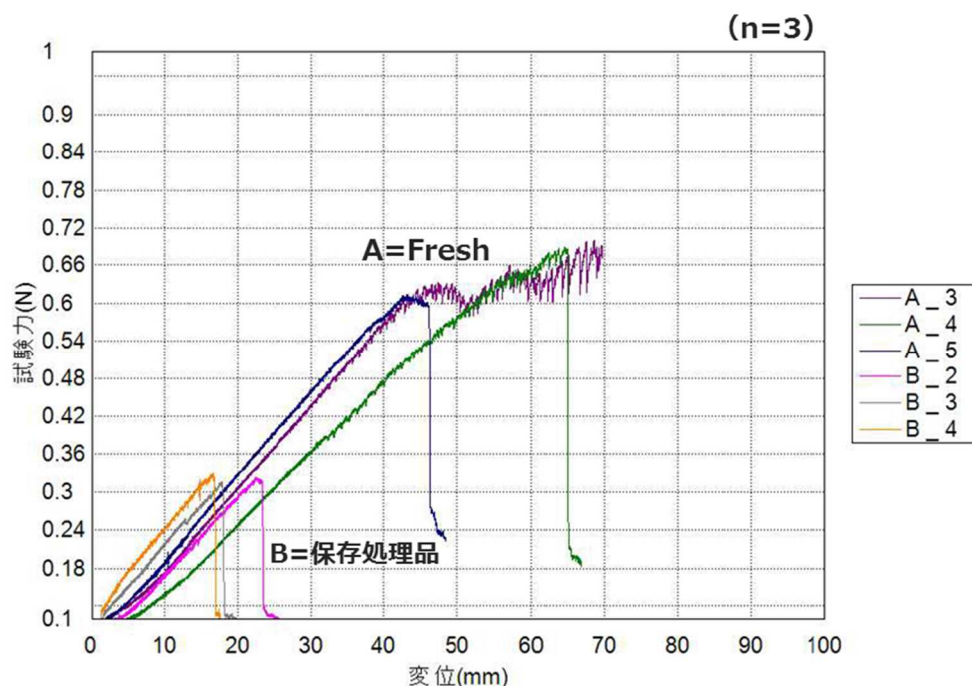


図 25 引張試験時の変位と試験力の関係

マイコプラズマ否定試験については、東京医科歯科大学の特許技術を使用した MycoFinder（日水製薬）を用いたマイコプラズマ否定試験（NAT）の施設バリデーションを実施した。

また、原材料として使用するウシ血清の受け入れ検査としてマイコプラズマ否定試験（PCR 法）を実施したところマイコプラズマ核酸が検出された。このマイコプラズマ混入の原因を特定するため、マイコプラズマ否定試験（DNA 染色法）を実施し、血清中のマイコプラズマが生菌、もしくは死菌由来の核酸の混入が原因か特定を試みると同時に、当該ウシ血清のシーケンス解析を実施した。その結果、マイコプラズマ否定試験（DNA 染色法）からウシ血清中のマイコプラズマは死菌由来の核酸であった。シーケンス解析結果から、ウシ血清中に混入していたマイコプラズマは、*Mycoplasma bovis* であり、検査工程中の汚染ではなく、ウシ血清中に核酸として残存していたことが証明された（図 26）。これらのことから、ウシ血清を用いた再生医療製品は、死菌マイコプラズマ由来の核酸が原材料に混入するリスクを評価するとともに、製品の品質および安全性に対する影響を確認して原材料受け入れ基準を設定する必要がある。

Range 1: 722909 to 723303 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
725 bits(392)	0.0	394/395(99%)	0/395(0%)	Plus/Minus	
Query 1		GTAACRAGGTATCCCTACGAGAACGTGGGGATGGATTACCTCCTTTCTACGGAGTACACT		60	
Sbjct 723303		GTAACRAGGTATCCCTACGAGAACGTGGGGATGGATTACCTCCTTTCTACGGAGTACACT		723244	
Query 61		TGCTTTTATCACTATaaaaaaaaGACTTATAACCAAAATTACTAGACCTATATTTATT		120	
Sbjct 723243		TGCTTTTATCACTATAAAAAAAAAGACTTATAACCAAAATTACTAGACCTATATTTATT		723184	
Query 121		ATAAACGTCATGGCTTTTATTAATAGGTCAAAAGCTATATATCTAGTTTTCAGAGAACA		180	
Sbjct 723183		ATAAACGTCATGGCTTTTATTAATAGGTCAAAAGCTATATATCTAGTTTTCAGAGAACA		723124	
Query 181		TCTCTCATATGTTCTTTGAAAACCTGAATAGTAAAAATATTTTCGATATTTACAACGACA		240	
Sbjct 723123		TCTCTCATATGTTCTTTGAAAACCTGAATAGTAAAAATATTTTCGATATTTACAACGACA		723064	
Query 241		CAAAAATCAAAATTAATGGTTAATTTGTTTGGATTTCATCGAGTAAGTCATATTTAATATGA		300	
Sbjct 723063		CAAAAATCAAAATTAATGGTTAATTTGTTTGGATTTCATCGAGTAAGTCATATTTAATATGA		723004	
Query 301		TTCATTGAAATGCTTAAAAATACACATCTAAAACTAACCAATAGGAAAAATACTACTTT		360	
Sbjct 723003		TTCATTGAAATGCTTAAAAATACACATCTAAAACTAACCAATAGGAAAAATACTACTTT		722944	
Query 361		TAAATAAGGAAGAGTTTTTGGTGGATGCCTTGGGT	395		
Sbjct 722943		TAAATAAGGAAGAGTTTTTGGTGGATGCCTTGGGT	722909		

Range 2: 716259 to 716651 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
717 bits(373)	0.0	390/396(98%)	3/396(0%)	Plus/Minus	
Query 1		GTAACRAGGTATCCCTACGAGAACGTGGGGATGGATTACCTCCTTTCTACGGAGTACACT		60	
Sbjct 716651		GTAACRAGGTATCCCTACGAGAACGTGGGGATGGATTACCTCCTTTCTACGGAGTACACT		716592	
Query 61		TGCTTTTATCACTATaaaaaaaaGACTTATAACCAAAATTACTAGACCTATATTTATT		120	
Sbjct 716591		TGCTTTTATCGCTATAAAAAA---GACTTATAACCAAAATTACTAGACCTATATTTATT		716535	
Query 121		TATAAACGTCATGGCTTTTATTAATAGGTCAAAAGCTATATATCTAGTTTTCAGAGAACA		180	
Sbjct 716534		TATAAACGTCATGGCTTTTATTAATAGGTCAAAAGCTATATATCTAGTTTTCAGAGAACA		716475	
Query 181		TCTCTCATACGTTCTTTGAAAACCTGAATAGTAAAAATATTTTCGATATTTACAACGACA		240	
Sbjct 716474		TCTCTCATATGTTCTTTGAAAACCTGAATAGTAAAAATATTTTCGATATTTACAACGACA		716415	
Query 241		TCAAAATCAAAATTAATGGTTAATTTGTTTGGATTTCATCGAGTAAGTCATATTTAATATG		300	
Sbjct 716414		TCAAAATCAAAATTAATGGTTAATTTGTTTGGATTTCATCGAGTAAGTCATATTTAATATG		716355	
Query 301		ATTCAITGAAATGCTTAAAAATACACATCTAAAACTAACCAATAGGAAAAATACTACTT		360	
Sbjct 716354		ATTCAITGAAATGCTTAAAAATACACATCTAAAACTAACCAATAGGAAAAATACTACTT		716295	
Query 361		TAAATAAGGAAGAGTTTTTGGTGGATGCCTTGGGT	396		
Sbjct 716294		TAAATAAGGAAGAGTTTTTGGTGGATGCCTTGGGT	716259		

図 26 ウシ胎児血清のシーケンス解析結果

製品の品質設計では、最終製品の品質評価項目として生細胞数を反映した指標が適切である。これまで、培養真皮のように最終製品から生細胞がトリプシン分散し難い場合には、MTT 法による生細胞数の相対評価を実施してきたが、出荷試験として採用するには絶対値として規格を設定することができない。また、培養真皮にはコラーゲン等の細胞外基質を多く含まれるため、コラゲナーゼとトリプシンの組み合わせによる細胞分散を検討する必要がある。

4) 医師主導治験の実施

治験プロトコル骨子の策定と相談

Ⅲ度熱傷創、深達性Ⅱ度熱傷創および採皮創を対象とした同種培養表皮の Feasibility 試験を医師主導治験で行う内容について、生物統計学的に妥当性のあるエンドポイントと症例設計について検討し、プロトコル骨子を作成した。京都大学臨床研究センターとプロトコルの妥当性について協議した上、PMDA と RS 戦略相談対面助言を計画した。

医師主導治験の準備と実施

京都大学が医師主導治験として行う同種培養表皮の Feasibility 試験について、京都大学臨床研究センターと協力体制を構築した。治験プロトコルの妥当性について PMDA と RS 戦略相談対面助言を計画した。

4. まとめ

本事業における重要な成果は、再生医療等製品の原材料となる国産の同種セルバンクの製造ルールを確定したことである。

ヒト組織・細胞の原料入手に先立ち、われわれはドナースクリーニングおよびセルバンクに対して実施するウイルス試験項目について、PMDA との薬事戦略相談（再生医療等製品等の品質及び安全性に係る相談）を実施し、その内容を盛り込んだ安全性評価スキームを確立した。このウイルス安全性評価のスキームは、PMDA から受け入れ可能であると判断された非常に汎用性の高い指標である。

大量生産・消費される同種製品はヒト細胞が広く大勢に移植されるため、ウイルス安全性に対する対応が重要課題であった。ドナーに対するウイルス感染のウィンドウピリオドを勘案した再検査を設定する等、最大限のリスク評価を行うことにより、汎用性の高い標準的な評価指標を確立することができた。

一方で、ウィンドウピリオドを勘案した再検査（採血）は、ドナー負担が最も大きい項目であることが判明した。今回、ヒト組織は外科手術における余剰皮膚を提供いただいたため、組織採取に伴うドナーの負担はなかったものの、再採血は本来ドナーにとって必要のない侵襲である。特に、細胞増殖能の高さから同種細胞ソースのドナー候補として対象となる乳幼児にとっては、採血の負担は無視できない。本事業を通して、ヒト組織・細胞原料入手における倫理的課題が浮き彫りとなった。

また、本事業では担当医に医療行為以外の様々な実務を依頼した。本来であれば第三者のコーディネーターが行うことが望ましいが、コーディネーターは研究全体の理解が必要不可欠であり、教育期間や雇用が必要となる。今後、企業が医療機関よりヒト組織・細胞の原料を安定的に入手するためには、コーディネーターの育成や雇用状態等、医療機関の後ろ盾となる国内環境が整備されることが望ましい。

今回、実製造した同種セルバンクは、年間数 10 万個の製品を出荷した場合でも、半世紀以上にわたって製造を継続することが可能である程の十分なスケールである。これらは、事前に検討した連続継代試験から推定した理論値と同等であった。連続継代試験の経過から細胞増殖能や継代数の上限、製品数を推計し、セルバンクの継代数やスケールを試算する方法は、他細胞のセルバンクを構築する場合も非常に有用であることが示された。

また、多指症や副耳等は治療として外科的な切除手術が行われるため、組織提供のドナー候補となる。これらの疾患の発症は、多くの場合単一遺伝子の変異ではなく、発生過程におけるシグナル異常が原因と考えられている。今回、核型分析試験の結果からも、これらの疾患に共通する染色体異常は確認されなかった。特に多指症は、皮膚以外にも軟骨や骨髄の細胞ソースにもなり得る有用性の高い組織であり、遺伝学的に問題のない対象であることが確認された。

同種セルストックは、当初の計画通り 10 細胞の目標数を製造した。そしてドナースクリーニングや細胞増殖能を始めとする品質評価や安全性評価試験を実施した結果、同種培養皮膚の原材料として最適なドナー細胞を選択することができた。これら一連の製造フローは、再生医療等製品で用いる細胞種や対象疾患に応じた適切な特性評価項目を設定した上で、他製品にも広く展開できる手法である。

われわれは本研究で確立した同種セルバンクの製造手順を用いて、他の製品開発の原材料セルバンク

への展開を進めている。具体的には皮膚以外に、骨髄、滑膜、胎児付属物、歯髄などを想定しており、さらに多種多様な細胞の商業用セルバンクを構築し、大量生産を前提とした再生医療製品の開発を加速することが可能である。

今後は、ヒト細胞を商業利用する倫理的課題をアカデミアや国内企業と議論することが肝要であり、同種セルバンクをオープンアクセス可能な位置づけとして、日本の再生医療産業発展の起爆剤としたい。

以上